

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Polimorfismos en el gen del VEGF pueden asociarse a
desarrollo de proteinuria en pacientes trasplantados renales
tratados con inhibidores m-TOR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jesús Delgado Domínguez-Palacios

DIRECTORES

Ana Isabel Sánchez Fructuoso
Juan Carlos Ruiz San Millán

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL VEGF PUEDEN ASOCIARSE A
DESARROLLO DE PROTEINURIA EN PACIENTES TRASPLANTADOS
RENALES TRATADOS CON INHIBIDORES M-TOR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jesús Delgado Domínguez-Palacios.

DIRECTORES

Ana Isabel Sánchez Fructuoso

Juan Carlos Ruiz San Millán

- Universidad Complutense de Madrid.
- Facultad de Medicina.
- Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas.
- Departamento de Medicina.



- Título del trabajo: “Polimorfismos en el gen del VEGF pueden asociarse a desarrollo de proteinuria en pacientes trasplantados renales tratados con inhibidores m-TOR”.
- Autor: Jesús Delgado Domínguez-Palacios.
- Director de la Tesis Doctoral: Dra. Ana I. Sánchez Fructuoso.
- Director de la Tesis Doctoral: Dr. Juan Carlos Ruiz San Millán.
- Tutor de la Tesis Doctoral: Prof. Elpidio Calvo Manuel.
- Madrid, 2020.

*A Lorena, Ale y Carolina,
con todo mi cariño*

AGRADECIMIENTOS

A Ana Sánchez, ideóloga de esta Tesis, porque no habría podido llevar a cabo este proyecto sin ti. Gracias por apoyarme siempre, como compañera y como Jefa, y por mostrar tu confianza en mí y en mi trabajo.

A Juan Carlos Ruiz San Millán y a Elpidio Calvo Manuel, por su valioso apoyo y ayuda en este proyecto.

A Marisa Maestro, por su importante colaboración en esta investigación.

A compañeros y excompañeros del Servicio de Nefrología, en especial a Nati, porque no está reñido ser un/a gran médico y saber sonreír y disfrutar de tu profesión, y a Rosalía, un placer haber sido compañeros de trabajo.

A mis compañeros y amigos de la Facultad (Jose, Pablo, Michel, César, Alberto, Enrique), y a mis *viejos* amigos (Rafa muy especialmente, Raúl, Miguel...todos), por tantas cosas compartidas, y por “el aprender” a vivir y a saber disfrutar de la vida.

A mis suegros, Carmen y Antonio, y a Victoria, Paula, Carolina y Valentín, mi *otra* familia, por todo vuestro inmenso apoyo y ayuda, especialmente en un año complicado... Gracias.

A mi hermano Alfonso, compañero de batalla en media vida, porque sé que siempre estás si te necesito.

A mis padres, Suso y Maribel, porque siempre estáis a mi lado cuando necesito ayuda, y por enseñarme (o como mínimo intentarlo) a ser una persona honesta, altruista y responsable.

A Carolina y Alejandro, mis pequeños, los motores de mi vida... porque me dais fuerza, alegría y corazón para afrontar cualquier problema que se ponga por delante.

Y a Lorena, mi otra mitad, compañera, amiga y mujer. Sé que hay momentos duros, pero sé que juntos superamos siempre los obstáculos de nuestro camino. Sin ti habría sido imposible llevar a cabo este proyecto. Me siento afortunado de compartir la vida contigo, de ser tu otra mitad.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac: Anticuerpo.

ADEs: Anticuerpos Donante-Específicos.

Ag: Antígeno.

AMF: Ácido micofenólico.

ARA-II: Antagonista del receptor de la Angiotensina-II.

AT: Atrofia tubular.

BKV: Virus BK.

CsA: Ciclosporina A.

CMV: Citomegalovirus.

DCI: Disfunción crónica del injerto.

ERC: Enfermedad renal crónica.

EVL: Everolimus.

FG: Filtrado glomerular.

FI: Fibrosis intersticial.

FIAT-i: Fibrosis intersticial y atrofia tubular de origen inespecífico.

HiperTG: Hipertrigliceridemia.

HLA: Human Leucocyte Antigen.

HTA: Hipertensión arterial.

HVI: Hipertrofia ventricular izquierda.

ICN: Inhibidor de calcineurina.

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL-(n°): Interleuquina-(n°).

ImTOR: Inhibidor de Mammalian Target of Rapamycin.

MMF: Micofenolato mofetilo.

NAE: Nefroangioesclerosis.

NFAT: Nuclear factor of activated T cells.

NO: Óxido nítrico.

NTIC: Nefritis túbulo-intersticial crónica.

PI3k: Fosfatidil inositol 3 kinasa.

Post-tx: Post-trasplante.

Pro/Cro: Proteína en orina/Creatinina en orina.

PTLD: Trastorno linfoproliferativo postrasplante.

RCMA: Rechazo crónico mediado por anticuerpos.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

SRA: Sistema renina-angiotensina.

SRL: Sirolimus.

Tac: Tacrolimus.

TEM: Transformación epitelio-mesenquimal.

TFG(e): Tasa de filtración glomerular (estimada).

TG: Triglicéridos.

TGFβ1: Transforming growth factor beta-1.

TxR: Trasplante renal.

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor.

VI: Ventrículo izquierdo.

Vs: Versus.

WT: Wild type (tipo silvestre).

ÍNDICE PAGINADO

1	RESUMEN ESTRUCTURADO (<i>español e inglés</i>)	16
1.1	RESUMEN	16
1.1.1	Introducción	16
1.1.2	Objetivos	17
1.1.3	Material y métodos	17
1.1.4	Resultados	18
1.1.5	Conclusiones	19
1.2	SUMMARY	20
1.2.1	Introduction	20
1.2.2	Objectives	21
1.2.3	Material and methods	21
1.2.4	Results	22
1.2.5	Conclusions	23
2	INTRODUCCIÓN	25
2.1	Contexto histórico	25
2.2	Problemática del trasplante: Disfunción Crónica del Injerto	27
2.2.1	Evolución histórica de la nomenclatura	28
2.2.2	Factores de riesgo de la disfunción crónica del injerto	30
2.2.3	Nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina	32
2.2.4	Etiopatogenia de la disfunción crónica del injerto	34
2.3	Problemática del trasplante: Muerte con Injerto Funcionante	38
2.3.1	Mortalidad cardiovascular	38
2.3.2	Mortalidad por cáncer	39
2.4	Papel y aportación de los Inhibidores m-TOR	40
2.4.1	ImTOR versus ICN en la Disfunción Crónica del Injerto	41
2.4.2	ImTOR y riesgo cardiovascular	48
2.4.3	Rol antitumoral de los imTOR	50
2.4.4	Rol antiviral de los imTOR	51
2.5	Efectos secundarios de los ImTOR. Proteinuria	58
2.5.1	Toxicidad de los imTOR	58
2.5.2	Efectos secundarios de los imTOR	59
2.5.3	Proteinuria como efecto secundario de los imTOR	60
2.6	Daño renal y proteinuria mediados por los ImTOR y rol del VEGF.	64
2.7	Gen del VEGF: importancia de sus polimorfismos.	67

3	<i>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	72
3.1	Justificación	72
3.1.1	Importancia de la Farmacogenética	72
3.1.2	Importancia clínica del estudio	73
3.2	Hipótesis	75
3.3	Objetivos	75
3.3.1	Objetivo principal del estudio	75
3.3.2	Objetivos secundarios del estudio	75
4	<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	78
4.1	Diseño del estudio	78
4.2	Población a estudio	78
4.2.1	Criterios de inclusión:	79
4.2.2	Criterios de exclusión:	79
4.3	Registro de los datos	80
4.3.1	Datos demográficos y clínicos generales:	80
4.3.2	Datos de la conversión de ICN a imTOR:	80
4.3.3	Cronología de la recogida del resto de datos:	81
4.3.4	Datos recogidos en cada revisión específica de consulta:	81
4.3.5	Evolución:	83
4.4	Variables independientes	83
4.4.1	Variables generales del paciente y del trasplante renal:	83
4.4.2	Variables de la conversión:	84
4.4.3	Variables clínico-analíticas	85
4.4.4	Polimorfismos del gen del VEGF:	86
4.5	Variables dependientes	87
4.5.1	Proteinuria	87
4.5.2	Variable proteinuria al año (P800).	87
4.5.3	Función renal	88
4.5.4	Suspensión del imTOR:	88
4.5.5	Supervivencia del injerto:	88
4.5.6	Supervivencia del paciente:	89
4.6	Ámbito del estudio y medios disponibles	89
4.6.1	Ámbito del estudio	89
4.6.2	Medios disponibles	89
4.7	Determinación de los polimorfismos genéticos	91
4.7.1	Extracción del ADN	91

4.7.2	Cuantificación y determinación de la pureza del ADN	91
4.7.3	Genotipado de los polimorfismos	91
4.7.4	Elección de los SNP estudiados.....	95
4.8	Determinación de los anticuerpos donante-específicos	95
4.9	Análisis estadístico	96
4.10	Limitaciones del estudio	98
4.10.1	Validez interna	98
4.10.2	Validez externa.....	98
4.11	Consideraciones éticas	99
5	RESULTADOS.....	101
5.1	Población a estudio	101
5.2	Análisis descriptivo de la población a estudio	102
5.2.1	Etiología de la enfermedad renal	103
5.2.2	Tratamiento inmunosupresor de la población a estudio.....	104
5.2.3	Indicación de conversión o inicio de imTOR	105
5.2.4	Historia oncológica como causa de conversión	107
5.2.5	Otras causas de conversión o inicio de imTOR	108
5.3	Incidencia de los polimorfismos del gen del VEGF	108
5.3.1	VEGF -1154 G>A	108
5.3.2	VEGF -2578 C>A.....	109
5.3.3	VEGF +936 C>T	109
5.3.4	Desequilibrio de ligamiento.....	110
5.4	Evolución de la proteinuria y la función renal.....	111
5.4.1	Valores basales y previos al imTOR de función renal y proteinuria	111
5.4.2	Función renal y proteinuria al año de tratamiento	112
5.4.3	Proteinuria superior a 800 mg/ día (P800).....	113
5.4.4	Evolución de la función renal según los SNP del VEGF.....	113
5.5	Análisis univariado para proteinuria (P800).....	115
5.5.1	Tipo de imTOR.....	116
5.5.2	Función renal basal	117
5.5.3	Tiempo post-trasplante de conversión	117
5.5.4	Edad del donante y del receptor.....	119
5.5.5	Primer trasplante versus re-trasplantes	120
5.5.6	Etiología de la enfermedad de base	121
5.5.7	Sexo	121
5.5.8	Hiperlipidemia	122

5.5.9	Proteinuria pre-existente	123
5.5.10	Otros factores relacionados con el tratamiento inmunosupresor	125
5.5.11	Bloqueo del sistema renina-angiotensina	127
5.5.12	Anticuerpos donante-específicos	128
5.6	Análisis univariado para P800 según los SNP del gen del VEGF	129
5.6.1	Polimorfismo VEGF -1154 G>A	129
5.6.2	Polimorfismo VEGF -2578 C>A	130
5.6.3	Polimorfismo VEGF +936 C>T	132
5.7	Análisis multivariado para proteinuria	134
5.8	Discontinuación del inhibidor m-TOR	139
5.9	Pérdida de la función renal del injerto	141
5.9.1	Supervivencia del injerto según proteinuria	142
5.9.2	Supervivencia del injerto según polimorfismos del VEGF	143
5.10	Supervivencia del paciente	148
5.10.1	Causas de muerte del paciente trasplantado	148
5.10.2	Supervivencia del paciente según proteinuria	149
5.10.3	Supervivencia del paciente oncológico según proteinuria	150
5.10.4	Supervivencia del paciente según polimorfismos del VEGF	153
6	DISCUSIÓN	159
6.1	Consideraciones generales de los imTOR	159
6.2	Diseño del estudio. Fortalezas y debilidades	161
6.3	Importancia de la proteinuria post-imTOR	165
6.3.1	Influencia de la proteinuria en la supervivencia del injerto	167
6.3.2	Influencia de la proteinuria en la supervivencia del paciente	168
6.4	Factores relacionados con la proteinuria post-imTOR en el análisis multivariado	169
6.4.1	Proteinuria basal como factor de riesgo	170
6.4.2	Filtrado glomerular basal disminuido y riesgo de proteinuria	171
6.4.3	Hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia	172
6.4.4	Tiempo post-trasplante de inicio del imTOR	173
6.4.5	Otras variables relacionadas con la proteinuria post-imTOR	174
6.4.6	Genotipo +936 C/T	175
6.5	Rol del VEGF y de sus polimorfismos en la proteinuria post-imTOR ...	176
6.5.1	Rol del VEGF en la proteinuria post-imTOR	176
6.5.2	Rol de los polimorfismos del VEGF	178
7	CONCLUSIONES	185

8	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	188
9	<i>ANEXOS</i>	229

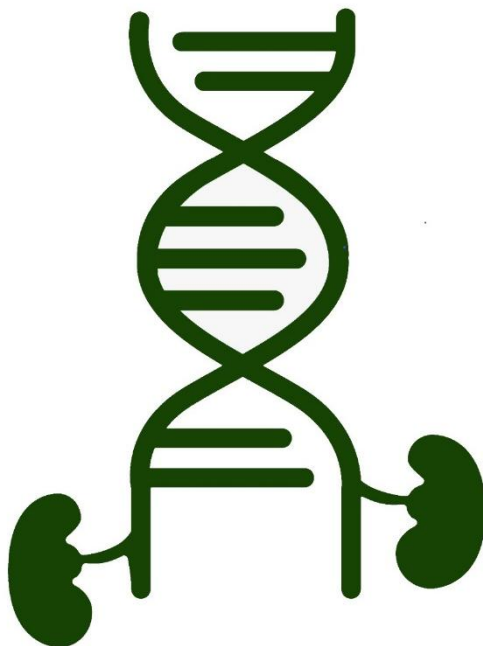
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores implicados en la disfunción crónica del injerto ¹⁷	30
Tabla 2. Ensayos clínicos randomizados de conversión ICN a imTOR.....	43
Tabla 3 Efectos adversos del tratamiento con imTOR.	59
Tabla 4. Secuencias de los primers directos e inversos y sondas de los SNP a estudio.	94
Tabla 5. Etiología de la enfermedad renal de base.	103
Tabla 6. Factores causales de conversión/inicio de im-TOR.	105
Tabla 7. Patología oncológica como indicación de im-TOR.....	107
Tabla 8. Incidencia de los SNP en las dos cohortes a estudio.	110
Tabla 9. Análisis univariable para proteinuria (P800).....	115
Tabla 10. Desarrollo de proteinuria según función renal basal.	117
Tabla 11. Proteinuria (P800) según SNP -1154.	129
Tabla 12. P800 en heterocigotos vs homocigotos para -1154.	130
Tabla 13. Proteinuria (P800) según SNP -2578.	131
Tabla 14. P800 en heterocigotos vs homocigotos para -2578.	131
Tabla 15. Proteinuria (P800) según SNP +936.	132
Tabla 16. P800 en heterocigotos C/T vs homocigotos <i>wild type</i> para +936.	133
Tabla 17 Análisis de regresión logística multivariado para P800*	136
Tabla 18. Causas de discontinuación del Inhibidor m-TOR.	140
Tabla 19. Causas de pérdida del injerto renal.....	142
Tabla 20. Causas de éxitus letalis.....	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acciones del VEGF en las células endoteliales y los podocitos.....	65
Figura 2. Esquema del ensayo Taqman® (JM Butler ²²⁷)	93
Figura 3. Número de conversiones a imTOR por año.....	101
Figura 4. Proteinuria (P800) en conversiones tempranas versus tardías.	118
Figura 5. Proteinuria (P800) según edad del donante.....	119
Figura 6. Proteinuria (P800) en primeros trasplantes versus re-trasplantes.	121
Figura 7. Proteinuria (P800) según el colesterol basal.	122
Figura 8. Proteinuria (P800) según la trigliceridemia basal.	123
Figura 9. P800 según el valor de proteinuria basal (PB) categorizada por cuartiles.	124
Figura 10. Porcentaje de P800 en función de la TFG y proteinuria basales.	125
Figura 11. Toma de corticoides y desarrollo de proteinuria (P800).	126
Figura 12. Bloqueo del SRA y proteinuria (P800).	128
Figura 13. Proteinuria (P800) en heterocigotos +936 VEGF vs homocigotos.....	133
Figura 14. Curva ROC del modelo predictivo de proteinuria al año post-imTOR	138
Figura 15. Suspensiones del tratamiento imTOR según proteinuria.	141
Figura 16. Supervivencia del Injerto según proteinuria.	143
Figura 17. Supervivencia del Injerto según SNP -1154.	144
Figura 18. Supervivencia del Injerto según alelo -1154G.	145
Figura 19. <i>Supervivencia del Injerto según SNP +936.</i>	147
Figura 20. Supervivencia del Paciente según Proteinuria.	150
Figura 21. Supervivencia del paciente oncológico según proteinuria.	151
Figura 22. Mortalidad por cáncer según proteinuria.	152
Figura 23. Supervivencia del Paciente según alelo -2578A.	154
Figura 24. Supervivencia del Paciente según alelo +936T.....	155
Figura 25. Mortalidad por cáncer según +936 C>T.	157
Figura 26. Fármacos y vías de inhibición de la actividad del VEGF (Estrada et al. ²⁶⁸)	178

1. RESUMEN ESTRUCTURADO



1 RESUMEN ESTRUCTURADO (español e inglés)

1.1 RESUMEN

1.1.1 Introducción

Los inhibidores de la calcineurina (ICN) continúan siendo la base del tratamiento inmunosupresor en el trasplante renal. Sin embargo, su carácter nefrotóxico y ciertos efectos deletéreos sobre el paciente pueden limitar la supervivencia del injerto a largo plazo, y contribuir a una mayor morbilidad y muerte del paciente con injerto funcionando.

Los inhibidores de la vía mTOR (imTOR) se postularon como alternativa a los ICN o como combinación para minimizar la exposición a éstos. Aunque han mostrado menos potencia inmunosupresora, son especialmente útiles en ciertos contextos clínicos, gracias a sus propiedades antiproliferativas y antivirales. Sin embargo, presentan una tasa de discontinuación elevada y una de las principales causas de suspensión es la proteinuria, marcador de daño renal asociado a menor supervivencia de injerto y paciente.

Aunque los mecanismos fisiopatogénicos de la proteinuria post-imTOR no se conocen con claridad, el *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) parece tener un rol importante en esta complicación. El VEGF es una proteína pleiotrópica compleja involucrada en la función y supervivencia de células endoteliales y podocitarias. Para ello, actúa a través de la cascada de señalización intracelular PI3K-Akt, que posteriormente activa la vía mTOR. Los imTOR, por tanto, interfieren en la actividad del VEGF, además de reducir su producción.

Por otro lado, el gen del VEGF es muy polimórfico, y varios de sus *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) se han relacionado con una producción proteica alterada.

La proteinuria post-imTOR no aparece sistemáticamente, por lo que es posible que la base genotípica o fenotípica del sujeto aumente la susceptibilidad de presentarla. Los SNP del gen del VEGF podrían influir en el desarrollo de proteinuria post-imTOR, dadas las implicaciones que tienen con la expresión proteica del mismo.

1.1.2 Objetivos

Analizar si los *Single Nucleotide Polymorphisms* del gen del VEGF -2578 C>A, -1154 G>A y -936 C>T influyen en el desarrollo de proteinuria al año de introducir tratamiento imTOR en el paciente trasplantado renal, tanto en terapia de conversión como en combinación con un ICN.

Como objetivos secundarios, evaluar la incidencia de estos SNP en las dos poblaciones analizadas; estudiar la evolución de la función renal y de la proteinuria en función de los SNP del VEGF; valorar qué factores son predictores de desarrollo de proteinuria post-imTOR; y analizar el impacto de la proteinuria en la supervivencia del injerto renal y del paciente a corto plazo.

1.1.3 Material y métodos

Entre los años 1999 y 2015 iniciaron tratamiento con imTOR 637 pacientes trasplantados renales de las cohortes pertenecientes al Hospital Clínico San Carlos (Madrid) y al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). El presente trabajo es un estudio observacional retrospectivo realizado en dichas cohortes a partir de una base de datos prospectiva. Los criterios de inclusión fueron: introducción del imTOR a partir del tercer mes post-trasplante y tratamiento con este fármaco durante al menos 3 meses. Se

excluyeron las suspensiones de imTOR secundarias a un episodio de rechazo agudo. Fueron incluidos un total de 583 pacientes (376 [64,5%] pertenecientes a la cohorte de Madrid, y 207 [35,5%] a la de Santander).

Se revisaron datos demográficos (de donante y receptor); datos clínico-analíticos basales y al año post-imTOR (incluyendo tasa de filtrado glomerular estimada por CKD-EPI y proteinuria en orina de 24h); datos relacionados con el tratamiento farmacológico y datos evolutivos.

Se determinaron los genotipos de los SNP del gen del VEGF en un total de 419 pacientes. El ADN genómico fue extraído de sangre periférica mediante el DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Los genotipos fueron determinados mediante ensayos TaqMan® MGB (Applied Biosystem) y evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.

1.1.4 Resultados

La población a estudio presentó una media de edad basal de $55,7 \pm 13,4$ años, con un 67,6% de varones; un 15,1% fueron re-trasplantes y un 14,6% recibió el imTOR en terapia combinada con ICN. La función renal basal y al año post-imTOR fue similar ($46,0 \pm 18,3$ vs. $47,3 \pm 19,5$ ml/min, respectivamente) y la proteinuria aumentó significativamente de 291,5 (IQR:151-521) mg/día a 411,3 (237-801,5) mg/día, $p < 0,001$. Un 35,2% suspendió el imTOR (seguimiento total 76,5 [45,1-111] meses).

Se realizó un análisis de regresión logística multivariado para identificar los factores predictivos de proteinuria ≥ 800 mg/día al año post-imTOR (correspondiente al percentil 75 de la distribución global de la proteinuria al año, definida como P800). Encontramos los siguientes factores de riesgo: función renal basal deteriorada, mayor proteinuria pre-

existente, menor edad basal, mayor tiempo post-trasplante de inicio del imTOR, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, uso de bloqueantes del SRA y ser portador del genotipo +936 C/C: OR 2,36 (1,13 – 4,93), $p=0,022$. La proteinuria se asoció a una menor supervivencia del injerto (KM: $112,4\pm7,2$ meses los pacientes P800 vs. $176,0\pm3,1$ meses los no proteinúricos, $p<0,001$) y del paciente (KM: $130,7\pm7,5$ meses los pacientes P800 vs. $157,3\pm3,8$ meses los no proteinúricos, $p=0,001$). Los SNP no mostraron diferencias significativas en cuanto a supervivencia de injerto y paciente. Los sujetos portadores del alelo -1154G mostraron tendencia a peor supervivencia del injerto aunque no significativa ($p=0,08$) en probable relación a una mayor incidencia de ADEs post-imTOR (11% vs. 2,3%, $p=0,07$). Los sujetos portadores del alelo +936T presentaron tendencia a mayor supervivencia del paciente, aunque tampoco alcanzó la significación estadística ($p=0,07$).

1.1.5 Conclusiones

La introducción de un imTOR está asociada a aparición o aumento significativo de proteinuria al año de tratamiento.

Los pacientes heterocigotos C/T o portadores del alelo T en el SNP +936 del gen del VEGF pueden tener menos riesgo de desarrollar proteinuria tras conversión/inicio de tratamiento con un imTOR.

La proteinuria post-imTOR se asocia a una menor supervivencia del injerto y del paciente trasplantado. Factores de riesgo ya conocidos (función renal basal deteriorada, proteinuria preexistente, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e inicio tardío del imTOR) asociaron un mayor riesgo de proteinuria al año de tratamiento.

1.2 SUMMARY

1.2.1 Introduction

A calcineurin inhibitor (CNI)-based regimen is the cornerstone of immunosuppressive therapy after kidney transplantation. However, the nephrotoxic effect of CNIs and certain deleterious effects on the patient can limit long-term graft survival and contribute to greater morbidity and death in the patient with a functioning graft.

M-TOR inhibitors (mTORi) were postulated as an alternative alone or in combination with CNI to minimize cumulative exposure to them. Although they have shown less immunosuppressive potency, they are especially useful in certain clinical settings, thanks to their antiproliferative and antiviral properties. However, they have a high discontinuation rate and one of the main causes of discontinuation is proteinuria, a marker of kidney damage associated with lower graft and patient survival.

While the physiopathogenic mechanisms of post-mTORi proteinuria are not clearly understood, the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) appears to play an important role in this complication. VEGF is a complex pleiotropic protein involved in the function and survival of endothelial and podocyte cells. To this end, it acts through the intracellular PI3K-Akt signaling cascade, which subsequently activates the mTOR pathway. mTORi, therefore, interfere with the activity of VEGF, in addition to reducing its production.

In another vein, the VEGF gene is highly polymorphic, and several of its Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) have been linked to altered protein production.

Post-mTORi proteinuria does not appear systematically, so it is possible that the genotypic or phenotypic basis of the subject increases his susceptibility to it. The SNPs

of the VEGF gene could influence the development of post-mTORi proteinuria, given the implications they have on its protein expression.

1.2.2 Objectives

To analyze if the Single Nucleotide Polymorphisms of the VEGF gene -2578 C> A, -1154 G> A and -936 C> T influence the development of proteinuria one year after introducing mTORi treatment in kidney transplant recipients, both in conversion therapy and in combination with a CNI.

As secondary objectives, to evaluate the incidence of these SNPs in the two populations analyzed; to study the evolution of renal function and proteinuria according to the VEGF SNPs; to evaluate which factors are predictors of post-mTORi proteinuria; and to analyze the impact of proteinuria on renal graft and patient survival in the short-term.

1.2.3 Material and methods

Between 1999 and 2015, 637 kidney transplant recipients from the cohorts belonging to Hospital Clínico San Carlos (Madrid) and Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) began treatment with mTORi. The present work is a retrospective observational study carried out in these cohorts using a prospective database. The inclusion criteria were: introduction of mTORi from the third month post-transplantation and treatment with this drug for at least 3 months. M-TORi suspensions secondary to an episode of acute rejection were excluded. A total of 583 patients were included (376 [64.5%] belonging to the Madrid cohort, and 207 [35.5%] to the Santander one).

Demographic data (from donor and recipient); baseline and one year after mTORi initiation clinical-laboratory data (including glomerular filtration rate estimated by CKD-

EPI and 24-hour urine proteinuria); data related to pharmacological treatment and evolutive data were reviewed.

The SNP genotypes of the VEGF gene were determined in a total of 419 patients. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Genotypes were determined by TaqMan® MGB assays (Applied Biosystem) and evaluated by quantitative real-time PCR.

1.2.4 Results

Our population had a mean baseline age of 55.7 ± 13.4 years, 67.6% were men, 15.1% were re-transplants and 14.6% received mTORi in combination therapy with CNi. Glomerular filtration rate at baseline and one year after treatment was similar (46.0 ± 18.3 vs. 47.3 ± 19.5 ml / min, respectively) and proteinuria increased significantly from 291.5 (IQR: 151-521) mg / day to 411.3 (237-801.5) mg / day, $p < 0.001$. 35.2% discontinued mTORi (total follow-up 76.5 [45.1-111] months).

A multivariate logistic regression analysis was performed to identify predictors of proteinuria ≥ 800 mg / day at 1 year post-mTORi (corresponding to the 75th percentile of the global distribution of proteinuria at 1 year, defined as P800). We found the following risk factors: impaired baseline kidney function, higher pre-existing proteinuria, lower baseline age, longer post-transplant time to start of mTORi, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, use of RAS blockers and being a carrier of the genotype +936 C/C: OR 2,36 (1,13 – 4,93), $p = 0,022$. Proteinuria was associated with lower graft survival (KM: 112.4 ± 7.2 months for P800 patients vs. 176.0 ± 3.1 months for non-proteinuric patients, $p < 0.001$) and of the patient (KM: $130,7 \pm 7.5$ months in P800 patients vs. 157.3 ± 3.8 months in non-proteinuric patients, $p = 0.001$). The SNPs did not show significant

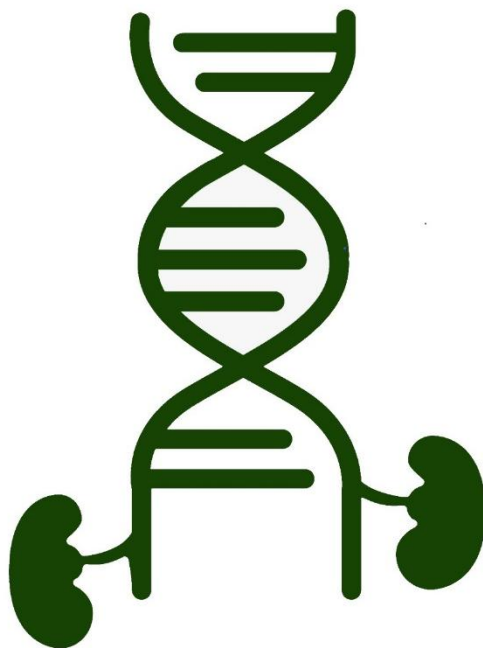
differences in terms of graft and patient survival. Carriers of the -1154G allele showed a tendency to worse graft survival, although not significant ($p=0.08$), probably related to a higher incidence of post-mTORi donor-specific antibodies (11% vs. 2,3%, $p=0,07$). Carriers of the +936T allele showed a trend towards greater patient survival, although it did not reach statistical significance either ($p=0,07$).

1.2.5 Conclusions

Introducing an mTORi is associated with the appearance (or significant increase) of proteinuria one year after treatment. Heterozygous C/T patients or carriers of the T allele in SNP +936 of the VEGF gene may have a lower risk of developing proteinuria after conversion / initiation of treatment with a mTORi.

Post-mTORi proteinuria is associated with reduced graft and recipient survival. Known risk factors (impaired baseline renal function, pre-existing proteinuria, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and late onset of mTORi) are associated with a higher risk of proteinuria at one year after treatment.

2. INTRODUCCIÓN



2 INTRODUCCIÓN

2.1 Contexto histórico

El primer trasplante renal (TxR) exitoso de la historia se llevó a cabo en Boston, el 23 de diciembre de 1954, de la mano de Murray, Merrill y Harrison. Fue un trasplante de donante vivo entre gemelos homocigotos. En los años sucesivos se consolidó el trasplante de donante vivo pero se constató que, exceptuando los casos de gemelos univitelinos, no era posible el éxito del órgano trasplantado sin disminuir o anular la reactividad natural del receptor frente a los antígenos de histocompatibilidad. Comenzó una búsqueda intensa de estrategias terapéuticas que disminuyesen la respuesta inmunológica y evitasen el rechazo del injerto, cuidando de no incrementar el riesgo de complicaciones (sobre todo infecciosas) y de mortalidad. Entre 1972 y 1976, Borel (Basilea) descubrió la potente acción inmunosupresora de la ciclosporina A (CsA), cuya inclusión fue generalizada en los años 80 en los protocolos de los centros trasplantadores; esto dio lugar a un aumento notable de la supervivencia del injerto¹.

Con la azatioprina (cuyo uso se extendió a partir de 1962) y la CsA las tasas de rechazo agudo disminuyeron significativamente (de incidencias superiores al 80% a un 40-50%² ³). Posteriormente, la introducción de nuevos inmunosupresores como el tacrolimus (Tac) y el micofenolato mofetil (MMF), entre otros, logró importantes avances en este sentido, con tasas de rechazo agudo descritas del 10-12%⁴. El mayor control de los episodios de rechazo agudo permitió que se alcanzasen tasas de supervivencia del injerto renal superiores al 90% al año del implante, según la mayoría de registros^{5 6 7}. Además, estos

logros reforzaron el trasplante renal como el modelo terapéutico de elección en la enfermedad renal crónica (ERC) terminal, ofreciendo mejor calidad de vida y expectativa de supervivencia que la diálisis^{8 9}.

Los importantes avances en el control del rechazo agudo, sin embargo, no se han acompañado de una clara mejoría en los resultados del TxR a largo plazo en la época más reciente¹⁰. En el año 2000 se publicaron los resultados del registro americano de trasplante (Hariraran et al.⁵). Se realizaron estimaciones de la vida media del injerto en función de los resultados obtenidos a corto-medio plazo, las cuales mostraron mejoría de la supervivencia del riñón trasplantado en la era post-CsA. Años después, los estudios de Meier-Kriesche, basados en el mismo registro, concluyeron que esta mejoría no había sido significativa a largo plazo¹⁰. Aunque se había logrado un incremento notable de la supervivencia del injerto durante el primer año de trasplante, el ritmo posterior de pérdidas de riñones funcionantes mantenía una pendiente similar a la observada dos décadas antes¹¹. Esto sugiere que los factores que determinan la supervivencia del injerto a largo plazo no han cambiado sustancialmente con el paso de los años. En la actualidad, esto es uno de los grandes puntos de discusión en el ámbito del TxR, y ha llevado a buscar perfiles diferentes en el diseño de nuevos fármacos inmunosupresores o nuevas estrategias en el manejo de los mismos³. También ha llevado al desarrollo de *scores* que predicen el riesgo de retraso en la función del injerto (Rodrigo et al.¹²), o identifican a los pacientes con alto riesgo de mortalidad a partir del primer año post-trasplante (post-tx), como el publicado en 2009 por el *Grupo Español de Disfunción Tardía del Injerto*¹³.

Varios factores se han relacionado con la limitación del éxito del TxR a largo plazo. La disfunción crónica del injerto fue descrita como la principal causa de pérdida del injerto

(alrededor de un 40-50%) a partir del primer año post-tx, y se relacionó con factores inmunológicos (rechazo crónico) y no inmunológicos (nefrotoxicidad, recidiva de la ERC de base...) ¹⁴. La muerte del paciente con injerto funcionante también se ha descrito como una causa muy importante de pérdida del riñón trasplantado (30-40% de las pérdidas a largo plazo ¹⁵); la mortalidad se relaciona principalmente con enfermedades cardiovasculares (30-40%), neoplasias malignas y, en tercer lugar, cuadros infecciosos ¹⁵ ¹⁶. Por otro lado, los criterios de aceptación de donantes y receptores son menos restrictivos actualmente, contribuyendo a aumentar la morbilidad y a empeorar los resultados del TxR a largo plazo.

2.2 Problemática del trasplante: Disfunción Crónica del Injerto

La disfunción crónica del injerto (DCI) es una entidad clínico-patológica consistente en un descenso progresivo y relativamente lento del filtrado glomerular (FG) a partir del tercer mes post-tx, frecuentemente acompañado de hipertensión arterial (HTA) y proteinuria ¹⁷. Se definió inicialmente como diagnóstico de exclusión ¹⁸, lo que obliga a descartar causas inmunológicas del deterioro de función renal (rechazo agudo, subclínico o crónico) y otras entidades como recidiva de la enfermedad glomerular de base, glomerulonefritis de novo, nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina (ICN), nefroangioesclerosis (más frecuente en donantes subóptimos), estenosis de la arteria renal del injerto o nefropatía por poliomavirus ¹⁹. Ha sido considerada como la causa más frecuente de pérdida del injerto tras el primer año post-tx ¹⁴, con una incidencia mayor en la época más reciente en probable relación a una mayor realización de biopsias de protocolo.

2.2.1 Evolución histórica de la nomenclatura

En los años 50 se empezó a utilizar el término de “rechazo crónico” a partir de un caso, reportado por Hume²⁰, que mostraba obliteración arterial a nivel histológico a los 5 meses y medio de trasplante. Posteriormente, Porter y Jeannet describieron que la obliteración arterial era producida por una fibrosis intimal secundaria a un daño probablemente mediado por aloanticuerpos^{21 22}. El concepto “rechazo crónico”, empleado desde entonces, implica un daño continuado sobre el injerto de tipo inmunológico, difícilmente objetivable en muchas ocasiones, por lo que no es correcta su atribución de forma generalizada a los cuadros de deterioro crónico de función renal^{17 23}.

En 1991, LC Paul definió por primera vez el término “Nefropatía Crónica del Injerto” (NCI) como cambios histológicos de fibrosis intersticial (FI), atrofia tubular (AT), glomeruloesclerosis y arteriopatía en el riñón trasplantado²⁴. Este término fue aceptado en la Conferencia de Banff de 1993, proyecto internacional y multidisciplinar creado (previamente en 1991) con el objetivo inicial de evaluar y estadificar los cambios histológicos producidos en el rechazo agudo. Según la Conferencia de 1993, la NCI incluía 4 entidades: el rechazo crónico, la nefrotoxicidad crónica por ICN, la enfermedad vasculo-hipertensiva y la pielonefritis crónica o nefropatía por reflujo. Todas estas entidades podían expresarse inespecíficamente como lesiones de FI y AT en un injerto renal con daño crónico establecido²⁵. Si la NCI asociaba HTA, proteinuria y declive progresivo del FG se hablaba entonces de “disfunción crónica del injerto” o “daño crónico del injerto” (*chronic allograft damage*). Posteriormente, Halloran et al. definieron la NCI como un cuadro de deterioro de función renal, ulterior a los tres primeros meses post-tx, que excluye rechazo agudo, nefrotoxicidad, recurrencia de la enfermedad de base o

glomerulonefritis de novo, y se expresa con lesiones histológicas de FI, AT, engrosamiento fibroso de la íntima y glomerulopatía del trasplante²⁶.

La VIII Conferencia de Banff (Canadá, 2005) fue un punto de inflexión que determinó reemplazar el término “Nefropatía Crónica del Injerto” por el de “lesión crónica del injerto” (*chronic allograft injury*): diagnóstico de exclusión caracterizado por la expresión histológica de lesiones de FI y AT sin evidenciarse causa específica de las mismas (FIAT-i, Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular de origen Inespecífico). El daño histológico en esta entidad se graduó en base a las lesiones tubulares e intersticiales, independientemente del daño observado a nivel vascular y glomerular²⁷. De este modo se intentaba evitar el uso excesivo del concepto NCI, que podía englobar hasta entonces todas las causas de disfunción crónica del trasplante que asociaban la presencia de fibrosis. En la misma reunión de Banff de 2005 se definió por primera vez el concepto de “rechazo crónico mediado por anticuerpos”, caracterizado entonces por lesiones glomerulares y arteriales, y positividad para C4d en la biopsia renal²⁷. La definición de esta entidad implicaba importantes diferencias a nivel de manejo terapéutico y pronóstico respecto de la NCI. Las guías KDIGO en 2009, en consonancia con la reunión de Banff, también recomendaron evitar los términos “rechazo crónico” y “nefropatía crónica del injerto”, aconsejando emplear el de “daño crónico del injerto”²⁸.

A pesar de que el término de NCI ha continuado apareciendo en la literatura científica de los últimos años^{29 30}, se ha ido reemplazando gradualmente por las nuevas definiciones consensuadas y revisadas periódicamente (Conferencia de Banff). La nueva nomenclatura tiene como objetivo dar un diagnóstico más preciso para poder avanzar en el

conocimiento de la patogenia y manejo clínico de las entidades que producen deterioro y pérdida de función del injerto renal.

2.2.2 Factores de riesgo de la disfunción crónica del injerto

Se pueden clasificar como factores inmunológicos y no inmunológicos, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores implicados en la disfunción crónica del injerto¹⁷.

	Factores no inmunológicos	Factores inmunológicos
Pre-tx	Del donante: edad, FRCV, masa nefronal	Sensibilización previa
	Donante subóptimo	Trasplantes previos
	Tiempo de isquemia-reperfusión	Compatibilidad HLA
	Del receptor: comorbilidad previa; polimorfismos genéticos	
Post-tx	Del receptor: FRCV, cardiopatía, comorbilidad	Episodios de rechazo agudo / Rechazo subclínico
	Toxicidad por ICN	Inmunosupresión subóptima
	Infecciones por virus CMV y BK	Incumplimiento terapéutico
	Recidiva enfermedad de base	Anticuerpos donante-específicos
	Uropatía obstructiva	Rechazo crónico mediado por Ac

Pre/post-tx: pre/post-trasplante; FRCV: factores de riesgo cardio-vascular; CMV: citomegalovirus; Ac: anticuerpos.

Dentro de los factores inmunológicos, los episodios de rechazo agudo tienen una repercusión importante en el pronóstico del injerto renal a largo plazo. Cuando se establecen, pueden evolucionar a lesiones de tipo FI/AT, sobre todo si son recurrentes. A nivel general, los episodios de rechazo agudo son capaces de provocar una liberación de citoquinas que induce la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos a nivel vascular, las cuales contribuyen al engrosamiento miointimal. La arteriosclerosis generada en el injerto puede producir daño isquémico a nivel glomerular³¹, favoreciendo el desarrollo de glomeruloesclerosis. Una vez se establece ésta, los glomérulos conservados se hipertrofian, dando lugar a un aumento de la presión intraglomerular y a hiperfiltración. Estos cambios en la hemodinámica renal generan lesión a nivel del endotelio capilar, y favorecen la expansión mensangial y las lesiones características de la glomerulopatía crónica del trasplante³¹.

Tanto la FI como la arteriosclerosis son lesiones comunes como resultado de diferentes procesos, como la HTA, la nefrotoxicidad por ICN o el daño renal secundario a pielonefritis crónica o de repetición. En muchas ocasiones es difícil esclarecer la etiología de la pérdida de función del injerto, debido a la inespecificidad de estas lesiones histológicas, motivo por el cual estas entidades quedaban englobadas años atrás en el concepto de NCI³².

En 1998 se publicaron los resultados del estudio US FK506³³, que realizó biopsias de protocolo a 144 pacientes a los dos años post-tx: la biopsia fue diagnóstica de NCI en el 62% de los pacientes tratados con tacrolimus y el 72,3% de los que tomaban ciclosporina. La NCI se asoció a donantes añosos, diagnóstico de nefrotoxicidad por ICN, haber sufrido un episodio de rechazo agudo el primer año post-tx e infección por CMV, siendo en el

análisis multivariado la nefrotoxicidad y el rechazo agudo los dos predictores más importantes de NCI³³.

2.2.3 Nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina

La nefrotoxicidad producida por los ICN ha sido considerada clásicamente como el factor no inmunológico más importante relacionado con la DCI³⁴. A pesar de ello, los regímenes terapéuticos actuales continúan basándose en estos fármacos como piedra angular del tratamiento inmunosupresor en el TxR. Como se ha mencionado previamente, la introducción de los ICN a principios de los 80 consiguió reducir sustancialmente la incidencia de rechazo agudo con un menor riesgo de complicaciones infecciosas respecto a otras estrategias inmunosupresoras. Esto se tradujo en un notable aumento de la supervivencia del injerto a corto plazo³⁵. Sin embargo, debido a su carácter nefrotóxico, los ICN han sido precisamente señalados como uno de los principales factores limitantes de la supervivencia del injerto a largo plazo³⁵.

La toxicidad renal producida por los ICN puede expresarse de dos formas diferentes: aguda y crónica. La forma aguda afecta de manera funcional al injerto, es dosis dependiente y está mediada fundamentalmente por un descenso del flujo sanguíneo renal y, por ende, del FG³⁶. Por su parte, la toxicidad crónica de los ICN no es dosis dependiente y se caracteriza por desarrollo de FI junto a otros cambios estructurales en el parénquima renal: hialinosis arteriolar, microcalcificaciones y atrofia a nivel tubular, y finalmente glomeruloesclerosis^{36 37 38}. No se conocen con claridad los mecanismos exactos por los que se desencadena la toxicidad crónica por ICN. Tanto la CsA como el Tac actúan formando un complejo con una inmunofilina intracelular que inhibe la activación de la calcineurín-fosfatasa. Esta fosfatasa es responsable de defosforilar e inducir la

transferencia al núcleo celular de una importante proteína reguladora, el NFAT (Factor Nuclear de Activación de la célula T), que a su vez estimula la transcripción y síntesis de interleukina-2 y otras citoquinas necesarias para la activación del linfocito. Se han descrito algunos mecanismos o factores que juegan un papel importante en la patogenia de la nefrotoxicidad por ICN. Por un lado, se producen alteraciones en la hemodinámica renal debido a un desequilibrio entre factores vasoconstrictores y vasodilatadores. El aumento de la endotelina-1 y el tromboxano, y la activación del sistema renina-angiotensina (SRA) provocan vasoconstricción de la arteriola aferente³⁹, mientras que factores vasodilatadores como la prostaciclina, la prostaglandina E2 y el óxido nítrico (NO) se encuentran reducidos. Por otro lado, el gen promotor del COX-2 contiene sitios de unión para el NFAT⁴⁰, por lo que los ICN pueden disminuir su expresión favoreciendo la vasoconstricción aferente, la reducción del FG y la retención de sodio y potasio^{41 42}. Adicionalmente, la inhibición del NO junto al incremento de formación de radicales libres y de producción de superóxidos pueden contribuir al desarrollo de HTA y al descenso del FG a medio-largo plazo⁴³.

En cuanto a las lesiones histológicas, la fibrosis intersticial con distribución típica en bandas se ha descrito como una constante en los cuadros de toxicidad crónica por ICN. En algunos estudios se ha objetivado que los ICN pueden incrementar de forma mantenida la expresión del TGF-beta^{44 45}. Este factor induce fibrosis aumentando la producción y disminuyendo la degradación de proteínas de la matriz extracelular, y es capaz de estimular la transición epitelio-mesenquimal de las células tubulares. En diversas publicaciones se ha sugerido este efecto pro-fibrótico de los ICN, objetivándose un grado de fibrosis relacionado con el tiempo de exposición al fármaco⁴⁶. A nivel general, la FI es una lesión histológica que aparece con frecuencia en fases avanzadas del daño renal,

asociándose a cambios estructurales parenquimatosos de carácter irreversible y a un declive progresivo del FG⁴⁷. También se ha descrito FI en riñones nativos de pacientes receptores de órgano sólido no renal⁴⁸. A finales de los años 80 se reportó una alta prevalencia de disfunción renal a los 36 meses post-tx cardíaco en pacientes tratados con CsA⁴⁹. En el estudio de Ojo et al.⁴⁸, se describió una incidencia acumulada de ERC a los 5 años post-tx (todos bajo tratamiento con ICN) del 21,3% en receptores de trasplante intestinal, 18,1% en trasplantados hepáticos, 15,8% en pulmonares, 10,9% en cardíacos y 6,9% en trasplante combinado pulmón-riñón.

Además de la FI, la hialinosis arteriolar, generalmente de tipo nodular, es una lesión típicamente asociada a la toxicidad crónica por los ICN, aunque no específica de la misma^{50 51}. Se caracteriza por necrosis de la célula muscular lisa de la arteriola y su sustitución por depósitos nodulares hialinos. Otras lesiones descritas asociadas al uso crónico de los ICN incluyen alteraciones de las células tubulares en forma de microcalcificaciones y microvacuolizaciones típicamente isométricas; la AT (habitualmente asociada a las lesiones de FI), y la esclerosis glomerular. Todos estos cambios histológicos son inespecíficos, lo cual dificulta en muchas ocasiones el diagnóstico diferencial de nefrotoxicidad por ICN.

2.2.4 Etiopatogenia de la disfunción crónica del injerto

La disfunción crónica del trasplante puede ser debida a diferentes entidades: la más importante es el rechazo crónico mediado por anticuerpos, considerada actualmente como la segunda causa más frecuente de pérdida del riñón trasplantado tras la muerte del paciente con injerto funcionante. Otras entidades causantes de disfunción crónica son la recidiva de la ERC de base, las glomerulonefritis de novo y la FIAT-i.

Precisamente, las lesiones de FI y AT se encuentran presentes en alrededor del 25% de las biopsias al año del implante⁵². Con frecuencia tienen un origen inespecífico, y se ha evidenciado que sólo se correlacionan con fallo del injerto cuando asocian signos de inflamación túbulo-intersticial⁵³. El desarrollo de FIAT-i se ha considerado secundario a diferentes factores o insultos inmunológicos y no inmunológicos (incluyendo la exposición a los ICN), por lo que tiene un carácter típicamente crónico, acumulativo y progresivo⁵⁴. No se conoce con exactitud la patogenia de la fibrogénesis en el trasplante. Parece estar mediada por citoquinas y factores de crecimiento y se origina a partir de un proceso morfogénico de transformación de las células epiteliales en células mesenquimales, denominado transición epitelio-mesenquimal (TEM)⁵⁵. Este proceso parece desencadenarse a nivel de las células epiteliales tubulares después de estar sometidas a una situación de hipoxia y a un exceso de liberación de factores como TGF- β 1 e IL-1. A continuación, se producen una serie de mecanismos predeterminados genéticamente como son: la pérdida de adhesión celular, con inhibición de la expresión de cadherina-E; reorganización de las fibras de actina; disrupción de la membrana basal del epitelio tubular; y migración celular e invasión de miofibroblastos. Estas células se caracterizan por expresar de novo α -actina de músculo liso y se encargan de sintetizar colágenos tipo I y III y fibronectina⁵⁶, generando un acúmulo de matriz extracelular que finalmente degenera en lesiones de FI/AT. La TEM ha sido evidenciada histológicamente en trasplantes renales perdidos tardíamente. Estos injertos mostraban en la biopsia preimplante pérdida de marcadores de células epiteliales, como cadherina-E y citoqueratina, y sobreexpresión de marcadores de síntesis de colágeno y de células de tipo mesenquimal, como la α -actina de músculo liso y la vimentina⁵⁷.

Por otra parte, el rechazo crónico mediado por anticuerpos (RCMA), responsable de más de la mitad de las pérdidas tardías de injertos renales, es foco de estudio e investigación importante como causa de disfunción del trasplante. Puede originarse a partir de un tratamiento inmunosupresor insuficiente o inestable, como ocurre en los casos de mala adherencia terapéutica del enfermo, o en relación a reducciones de la carga inmunosupresora debido a cuadros infecciosos graves o neoplasias. La disminución de los niveles de inmunosupresión puede generar inflamación a nivel microvascular e intersticial, y en ocasiones asocia lesiones de glomerulopatía del trasplante, aparición de anticuerpos donante-específicos (ADEs) circulantes y depósito de la fracción del complemento C4d en los capilares peritubulares.

El proceso de rechazo (tanto agudo como crónico) se puede generar también a partir de antígenos no-HLA⁵⁸, por lo que una compatibilidad HLA completa no descarta el riesgo de rechazo del injerto. Es el caso de los antígenos de histocompatibilidad menor o los antígenos MICA y MICB de las células endoteliales (MIC, del inglés, *Major-histocompatibility-complex class I Chain-related genes*), que pueden jugar un papel relevante en el trasplante, aunque bastante desconocido hasta el momento⁵⁹. Otros anticuerpos (Ac) reportados en la literatura con implicación en el RCMA son los Ac frente a la glutatión S-transferasa T1⁶⁰ y los Ac frente al receptor de la angiotensina-II⁶¹.

A lo largo de los años se han ensayado distintos tratamientos muy agresivos para frenar el RCMA sin obtenerse resultados óptimos, por lo que actualmente el objetivo se focaliza en la prevención del desarrollo del RCMA para reducir su incidencia y, consecuentemente, mejorar la supervivencia del injerto a largo plazo.

Otras teorías patogénicas acerca de la DCI se centran en el estrés oxidativo y en el desarrollo de senescencia celular. Diversos factores pueden favorecer un aumento del estrés oxidativo: el fenómeno de isquemia-reperfusión, la respuesta inflamatoria al rechazo agudo, el propio tratamiento inmunosupresor⁶² y otras complicaciones como la sepsis o cambios vasculares tardíos en el injerto renal⁶³. Los metabolitos tóxicos derivados del oxígeno pueden generar daño tisular estimulando la apoptosis⁶³, la TEM y la expresión celular de un fenotipo pro-senescente. Un estudio de Albrecht et al.⁶⁴ mostró una expresión incrementada de la sintetasa inducible de NO en el intersticio de injertos con daño crónico establecido, asociada a un aumento de las células productoras de especies reactivas de oxígeno, y a una expresión disminuida de la sintetasa endotelial de NO a nivel glomerular.

También se ha teorizado sobre la producción incrementada de citoquinas como base de la patogenia de la DCI. Según esta teoría, ésta se origina tras episodios repetidos de daño tisular agudo mediados por un exceso de citoquinas, los cuales finalmente conducen a lesiones de FI y de la pared vascular. El proceso de fibrosis está mediado principalmente por el TGF- β 1, aunque pueden estar implicados otros factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la endotelina-1 o el inhibidor del activador del plasminógeno-1¹⁷, entre otros.

Existen otros factores patogénicos de DCI descritos en la literatura. Por ejemplo, los relacionados con el polimorfismo I/D (inserción/delección) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), involucrado en la regulación de su concentración plasmática. Se ha demostrado que los pacientes portadores del genotipo D/D (delección/delección) desarrollan disfunción del injerto con mayor frecuencia que los no

portadores^{65 66}. En presencia del genotipo D/D, por tanto, podría estar indicado el tratamiento con IECAs para evitar la evolución a DCI.

2.3 Problemática del trasplante: Muerte con Injerto Funcionante

La muerte del paciente trasplantado con injerto funcionante constituye la segunda causa más frecuente de pérdida del injerto después de la DCI; aunque si clasificamos la DCI en función de su etiología exacta podría ser la más frecuente¹⁵. Es responsable de alrededor del 30-40% de las pérdidas de injertos renales. Las causas de mortalidad más frecuentes son la patología cardiovascular y las neoplasias malignas^{15 67 68}, aunque en determinadas poblaciones, como la coreana, se ha descrito la patología infecciosa como la primera causa de mortalidad en estos pacientes⁶⁹.

2.3.1 Mortalidad cardiovascular

La mortalidad cardiovascular es 3-4 veces mayor en la población trasplantada renal respecto a la población general. Por un lado, son pacientes con una alta prevalencia de factores tradicionales de riesgo cardiovascular^{70 71}, como la diabetes mellitus, el síndrome metabólico, la HTA y la hipertrofia ventricular izquierda. También pueden confluir factores previos al trasplante, como el tiempo sometido a diálisis o la historia previa de afectación cardiovascular o de cáncer, que han demostrado aumentar el riesgo de eventos cardíacos⁷². Sin embargo, los factores clásicos no justifican por completo la elevada mortalidad cardiovascular en estos pacientes. Un ejemplo de este hecho se muestra al aplicar los *scores* habituales de riesgo cardiovascular en la población trasplantada, los cuales frecuentemente subestiman dicho riesgo. Por tanto, otros factores específicos en

estos pacientes, como la disfunción del injerto⁷³, la proteinuria, la inflamación y los efectos del tratamiento inmunosupresor pueden jugar un papel importante a este respecto⁷⁴. Entre los fármacos inmunosupresores que aumentan el riesgo cardiovascular destacan, en primer lugar, los corticoides, y también los ICN, ciclosporina y tacrolimus, con conocidos efectos a nivel nefrotóxico, diabetogénico e hipertensivo^{73 74}.

2.3.2 Mortalidad por cáncer

La patología tumoral maligna constituye una causa de mortalidad relativamente al alza en la era moderna del trasplante renal^{75 76}. De hecho, se ha demostrado una mayor incidencia de cáncer en el receptor de TxR respecto a la población general y al paciente en diálisis^{77 78 79}, con una frecuencia especialmente elevada de tumores cutáneos como el carcinoma de células escamosas y el cáncer de células de Merkel. En el registro americano se evidenció, sobre una serie de más de 11.000 trasplantados de órgano sólido, el doble de riesgo de desarrollar cáncer en el postrasplante, y un riesgo aún mayor de tumores asociados a infecciones virales como el sarcoma de Kaposi y el linfoma no Hodgkin⁶⁸.

El tratamiento inmunosupresor es un factor de riesgo muy importante de oncogénesis post-tx, la cual puede estar mediada por acción directa de estos fármacos. Los ICN, en concreto, pueden inducir la expresión de TGFβ1, factor relacionado con la invasión y la diseminación tumoral⁸⁰, y estimular la expresión del VEGF⁸¹. Por otra parte, la depresión mantenida del sistema inmunitario puede favorecer infecciones oportunistas por virus oncogénicos, o alterar componentes del sistema inmune como las células *Natural Killer*, implicadas en la vigilancia inmunológica y la eliminación precoz de células malignas⁸². De forma indirecta, el continuo estímulo antigénico originado en el injerto sobre un sistema inmune deprimido de forma parcial, puede inducir el desarrollo de enfermedades

linfoproliferativas en el post-tx. Otros factores relacionados con el tratamiento inmunosupresor como el tiempo de exposición a ciertos fármacos, e incluso la dosis administrada, pueden repercutir en la incidencia y el tipo de neoplasia que aparece⁷⁹. Específicamente, los ICN han mostrado su implicación en el desarrollo de patología tumoral maligna, especialmente en cuanto a tumores cutáneos y trastornos linfoproliferativos^{75 83 84}.

La edad cada vez mayor del paciente trasplantado renal y el aumento actual de su esperanza de vida han contribuido a aumentar, más si cabe, la incidencia de patología oncológica⁸⁵; de hecho, algunos autores postulan que dentro de 20 años el cáncer podría ser la primera causa de mortalidad en estos enfermos⁸⁶. Además, el receptor de TxR tiende a tener una mayor refractariedad al tratamiento, mayor progresión tumoral y, en definitiva, peor pronóstico que el enfermo no trasplantado^{87 82}. Por tanto, las medidas enfocadas hacia la prevención y el diagnóstico precoz de la patología tumoral son fundamentales. A este respecto, el perfil que aportan los fármacos inhibidores de la vía m-TOR, rapamicina y everolimus, puede ser beneficioso desde el punto de vista oncológico gracias a sus propiedades antiproliferativas^{88 89}.

2.4 Papel y aportación de los Inhibidores m-TOR.

La utilización de los Inhibidores de la vía mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), tanto como base de la terapia inmunosupresora, como en combinación con los ICN, se ha consolidado a lo largo de los últimos 15 años^{90 91}.

Los inhibidores mTOR (imTOR), sirolimus y everolimus, son derivados macrólidos del *Streptomyces hygroscopicus* con importantes propiedades antiproliferativas y anti-

rechazo. Su mecanismo de acción está mediado por la unión con una inmunofilina intracelular, la FKBP12, y su efecto sobre la proteína nuclear mTOR, encargada de regular el ciclo celular. La conjugación de sirolimus/everolimus con la FKBP12 tiene acción sobre el mTOR de tal forma que se inhiben vías de transducción de la señal inducida por citoquinas, consiguiendo como resultado bloquear el ciclo celular en la fase G1-S, inhibir la síntesis proteica y de ADN, y suprimir la proliferación de células T mediada por las interleukinas IL-2 e IL-4.

2.4.1 ImTOR versus ICN en la Disfunción Crónica del Injerto

Dado el carácter nefrotóxico de los ICN y el rol que se les ha atribuido clásicamente en la DCI, se han diseñado estrategias para minimizar la exposición acumulada a estos fármacos con el objetivo de optimizar los resultados de función y supervivencia del injerto renal a largo plazo. Junto al creciente uso de los imTOR, varios estudios mostraron que la función renal puede experimentar una mejoría tras la retirada o minimización de los ICN³. Estos estudios parten de la hipótesis de que la conversión de un protocolo inmunosupresor basado en los ICN a otro régimen no nefrotóxico podría ser una estrategia eficaz a largo plazo siempre que se mantenga un efecto inmunosupresor adecuado.

En 2005, en un estudio de Watson et al.⁹² se randomizaron 40 pacientes trasplantados renales, etiquetados con el diagnóstico de “nefropatía crónica del injerto”, a continuar terapia de mantenimiento con CsA versus conversión a sirolimus (SRL). Los pacientes tratados con SRL presentaron, a partir de los 3 meses, una mejoría media de su FG de 8,5 mL/min respecto al basal, mientras que en el grupo tratado con CsA se objetivó una pérdida media de 4,3 mL/min de filtrado. Se evidenció una correlación positiva entre el FG basal y el incremento del mismo al año: la mejoría de función renal fue más marcada

en los pacientes con un FG basal superior. Otro trabajo de Stallone, en 84 pacientes, mostró que a los 2 años de conversión de CsA a SRL disminuía la expresión (a nivel vascular e intersticial) de la alfa-actina de músculo liso⁹³, considerada como un marcador de activación del fibroblasto. También la retirada de los ICN a partir de un protocolo inmunosupresor mixto (CsA más SRL) puede repercutir favorablemente en la función del injerto a largo plazo: un estudio prospectivo y randomizado de Oberbauer et al. mostró mejoría en la supervivencia del injerto y función renal (media de FG de 58 mL/min en el grupo sin ICN vs. 44 mL/min) 4 años después de la retirada precoz de la CsA⁹⁴.

A lo largo de los últimos años se han realizado varios ensayos clínicos randomizados para estudiar la conversión de ICN a imTOR (Tabla 2), realizada en diferentes momentos postrasplante. El objetivo principal, generalmente, fue comparar la evolución de la función renal entre ambas estrategias terapéuticas. En la mayoría de los estudios, la conversión a imTOR dio como resultado una mejoría del FG, especialmente en comparación con la CsA^{95 96 97 98 99 100}. Sin embargo, el beneficio no es tan evidente al comparar Tac versus imTOR^{101 102 103}. La conversión, además, se asocia a una mayor incidencia de rechazo (sobre todo vs. Tac) y a un porcentaje no desdeñable de discontinuación del imTOR por efectos adversos.

Tabla 2. Ensayos clínicos randomizados de conversión ICN a imTOR.

ESTUDIO	N Seguimiento	Tiempo post-tx de conversión	Grupo 1 (G1)	Grupo 2 (G2)	Función renal G1 vs. G2	Rechazo agudo biopsiado	Suspensión imTOR primer año	Proteinuria G1 vs. G2
Schena, 2009 CONVERT ¹⁰⁴	N=830 2 años	37 meses (6-60 meses)	SRL (555)	ICN (275)	ITT (743): 59 vs 58 mL/min (p=NS)	P=NS	20%	0,82 vs 0,4 g/día (p<0,001), en FG basal >40ml/min
Lebranchu, 2009 CONCEPT ⁹⁵	N=193 1 año	3 meses	Daclizumab* SRL+MMF+Cs (95)	Daclizumab* CsA+MMF+Cs (97)	ITT 69 vs 64 mL/min (p=0,017)	17% vs 8% (p=0,07)	16,8%	Efecto adverso: 9,4% vs 3,1% P=NS
Lebranchu, 2011 post-CONCEPT ⁹⁶	N=162 4 años	3 meses	Daclizumab* SRL+MMF+Cs (77)	Daclizumab* CsA+MMF+Cs (85)	ITT 63 vs 57 mL/min (p=0,013) OT 68 vs 57 mL/min (p=0,002)			OT 0,42 ±0,44 vs 0,26±0,37 g/día p=0,018 EA: 30% vs 12% p=0,035
Weir, 2010 SPARE The Nephron ¹⁰¹	N=299 2 años	115 días (1-6 meses)	SRL+MMF (148)	ICN+MMF (151)	ITT 62 vs 58 mL/min (p=0,03)	7,4% vs 6% (p=NS)	19,2%	3 suspensiones por proteinuria en el grupo de imTOR
Weir, 2017 ¹⁰⁵ Seguimiento SPARE The N.	N=128 8 años	115 días (1-6 meses)	SRL+MMF (66)	ICN+MMF (62)	ITT 63 vs 59 mL/min (p=NS)			Número limitado de pacientes analizados
Guba, 2010 SMART ⁹⁷	N=140 1 año	10-24 días	SRL+MMF+Cs (69)	CsA+MMF+Cs (71)	ITT 65 vs 53 mL/min (p=0,001) OT 67 vs 54 mL/min (p<0,001)	17,4% vs 15,5% (p=NS)	36,2%	Proteinuria de novo 7,3% vs 1,4% p=0,11
Guba, 2012 Seguimiento SMART ⁹⁸	N=132 3 años	10-24 días	SRL+MMF+Cs (66)	CsA+MMF+Cs (66)	ITT 61 vs 54 mL/min (p=0,031)		59,4% (3 años)	Efecto adverso: 10,1% vs 2,8% p=0,09

ESTUDIO	N Seguimiento	Tiempo post-tx de conversión	Grupo 1 (G1)	Grupo 2 (G2)	Función renal G1 vs. G2	Rechazo agudo biopsiado	Suspensión imTOR primer año	Proteinuria G1 vs. G2
Heilman, 2011 ¹⁰²	N=122 1 año	1 mes	SRL+MMF+Cs (62)	Tac+MMF+Cs (60)	ITT 60 vs 61 mL/min (p=NS) OT 66 vs 63 mL/min (p=NS)	13% vs 5% (p=NS)	37%	4 suspensiones por proteinuria en el grupo de imTOR
Mjörnstedt, 2012 CENTRAL ⁹⁹	N=202 1 año	7ª semana	EVL+MMF +Cs (92)	CsA+MMF +Cs (90)	ITT Δ 4,9 vs 0 mL/min (p=0,012) OT Δ 8,7 vs -0,4 mL/min (p<0,001)	27,5% vs 11% (p=0,004)	25,5%	Efecto Adverso: 4,9% vs 0% P=0,06
Budde, 2015 ZEUS ¹⁰⁰	N=300 5 años	4,5 meses	EVL (155)	CsA (145)	ITT 67 vs 60 mL/min (p=0,004) OT 69 vs 63 mL/min (p=0,044)	9,7% vs 3,4% (P=0,03)	17,4% (40% reinició ICN a 5 años)	496 ±1359 vs 220±319 mg/día (p=0,04)
Fijter, 2017 ELEVATE ¹⁰³	N=715 2 años	10-14 semanas	EVL+AMF+Cs (359)	ICN+AMF +Cs (356)	ITT 64 vs 60 mL/min (p=0,042) EVL 62 mL/min; vs Tac 59 mL/min p=NS; vs CsA 53 mL/min, p<,001	9,7% vs 4,8% (P=0,014) <i>No diferencias significativas con CsA</i>	23,6%	Pro/Cro 36,4 ±53 vs 19,1±27 p<0,001. EA: 15,3% vs 3,6%

EA: (reportado como) Efecto Adverso; Cs: corticoides; ITT: análisis por intención de tratar (*Intention-To-Treat*); OT: análisis por protocolo (*On-Treatment*); Δ: diferencia; Pro/Cro: cociente urinario proteína/creatinina (mg/mmol).

*Tratamiento de inducción.

En 2009 se publicaron los resultados del estudio multicéntrico CONVERT¹⁰⁴, llevado a cabo por Schena et al. en 830 pacientes. Se observó una pequeña mejoría de la función renal, a los 2 años, en el subgrupo de pacientes convertidos a SRL con una tasa de filtración glomerular (TFG) basal superior a 40 mL/min. Sin embargo, cerca del 20% de pacientes randomizados a imTOR precisaron discontinuar dicho tratamiento debido a efectos secundarios (entre ellos, hiperlipidemia, diarrea, anemia y edemas). A los dos años de comenzar el reclutamiento se decidió dejar de incluir trasplantados renales con una TFG inferior a 40 mL/min (estimada por la fórmula de Nankivell) debido a la elevada incidencia de empeoramiento de función renal y de efectos adversos post-conversión en este subgrupo.

Algo similar ocurrió en el ensayo clínico “Spare the Nephron”¹⁰¹: 305 pacientes trasplantados renales fueron randomizados, entre el primer y el sexto mes postrasplante, a continuar con ICN frente a conversión a SRL. Al año, la mediana de FG (calculada con iotalamato) del grupo tratado con SRL se incrementó en 6 mL/min ($p=0,02$), mientras que en el grupo de ICN el FG no se modificó significativamente respecto al basal (-3 mL/min, $p=NS$). Sin embargo, un 19,2% de sujetos tuvo que discontinuar el tratamiento con imTOR debido a reacciones adversas. A los 8 años de seguimiento, se continúa observando una tendencia (no significativa) a mantener un mejor FG en la población convertida a imTOR¹⁰⁵.

Entre los estudios de conversión precoz se encuentra el ensayo clínico CONCEPT⁹⁵ (y su extensión post-CONCEPT⁹⁶), en el que se aleatorizó a mantener CsA o cambiar a SRL al tercer mes post-tx. La rama de SRL presentó mejor función renal al año y a los 4 años, aunque no se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a supervivencia de injerto y paciente. En el estudio SMART⁹⁸ también se realizó conversión precoz (a los 10-24 días) de CsA a SRL, con resultados favorables al imTOR en cuanto a función renal a 1 y

a 3 años, aunque de nuevo sin diferencias en cuanto a supervivencia de injerto y paciente. Como contrapartida, el porcentaje de pacientes que discontinuaron el imTOR fue elevado (un 59.4% vs. un 42.3% del grupo de CsA a los 3 años). En el ensayo clínico CENTRAL⁹⁹ se randomizaron 202 pacientes a la séptima semana post-tx a mantener CsA vs. conversión a everolimus (EVL). Con el imTOR se observó una mejoría significativa del FG respecto al basal, pero un 25,5% lo discontinuó por efectos adversos; la tasa de rechazo agudo biopsiado también fue superior con SRL, aunque no repercutió en la supervivencia del injerto al año (100% con SRL). En el ensayo ZEUS¹⁰⁰, con conversión de CsA a EVL a los 4,5 meses, se evidenció mayor incidencia de rechazo agudo con imTOR (9,7% vs 3,4%, $p=0,03$), aunque con una supervivencia de injerto y paciente del 100%; hay que remarcar que al final del estudio (seguimiento total de 50 meses) un 40% de los pacientes convertidos había tenido que reiniciar el ICN.

Otros trabajos han descrito diversos problemas derivados del uso de los imTOR. Una revisión sistemática de estudios de conversión a SRL en pacientes con DCI mostró mejoría de la función renal a corto plazo en los pacientes convertidos¹⁰⁶. Como contrapartida, se encontró una elevada tasa de discontinuación del imTOR debido a efectos secundarios, siendo la proteinuria la causa reportada más frecuente.

Más recientemente se publicó el estudio ELEVATE¹⁰³, que con 715 trasplantados renales es el ensayo clínico de mayor envergadura hasta la fecha. Los pacientes fueron randomizados a continuar con ICN frente a conversión a EVL a las 10-14 semanas post-tx. Aunque la rama de EVL presentó una mejor TFG_e (TFG estimada) al año, en la comparativa exclusiva con Tac los resultados de función renal fueron similares, con una

mayor incidencia de rechazo, aparición de ADEs y efectos adversos que obligaron a la discontinuación (23,6%) en el grupo de EVL.

En un estudio de la Clínica Mayo¹⁰⁷ también se documentaron malos resultados clínicos respecto al tratamiento con imTOR (sirolimus) en 11 pacientes con glomerulopatía crónica de riñón nativo de diversas etiologías (glomeruloesclerosis focal y segmentaria, glomerulonefritis membrano-proliferativa, membranosa y nefropatía IgA) y que presentaban proteinuria igual o mayor a 1 gramo/ 24h. Todos los casos cursaron con fracaso renal agudo a partir de las 6 semanas de tratamiento, reversible parcialmente tras la retirada del SRL.

Los malos resultados con imTOR parecen depender, en parte, de una serie de factores. En un estudio de conversión tardía en 60 pacientes se observó que el principal determinante del deterioro progresivo de la función del injerto fue el mayor tiempo post-tx de inicio del imTOR, con ausencia de beneficio clínico cuando éste era iniciado después del quinto año de trasplante¹⁰⁸. Otro estudio de cohortes retrospectivo en 159 pacientes trasplantados, analizó conversiones de Tac a SRL realizadas en el contexto de DCI. Más de dos tercios de los pacientes que continuaron con SRL (y MMF) presentaron mejoría significativa de su TFG. Por el contrario, el subgrupo de pacientes que evolucionó a deterioro progresivo de función renal presentaba peor función basal (TFG media de 19 mL/min/1,73 m²) y realizaron la conversión de forma más tardía (34 versus 17 meses). En cuanto al desarrollo de proteinuria, un estudio de conversión a EVL en 220 pacientes, de Sánchez-Fructuoso et al.¹⁰⁹, mostró los siguientes factores de riesgo de proteinuria (considerando ≥ 900 mg/ día, el P75 de la muestra): aclaramiento de creatinina basal inferior a 60 mL/min, proteinuria basal ≥ 550 mg/ día, conversión posterior a los tres años

de trasplante, hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL y no recibir tratamiento con prednisona. Es interesante destacar que la proteinuria basal ≥ 550 mg/ día sólo fue factor de riesgo de pérdida del injerto en los pacientes convertidos después del tercer año postrasplante. Otro estudio retrospectivo de Ruiz et al.¹¹⁰, en 149 pacientes con DCI, también describió beneficio post-conversión sólo en los pacientes con mejor función basal y menor proteinuria. Por otro lado, debido a la mayor tasa de rechazo asociada a los imTOR descrita en la literatura, es recomendable extremar la precaución si se plantea una conversión precoz a imTOR en un paciente con riesgo inmunológico moderado-alto.

2.4.2 ImTOR y riesgo cardiovascular

Los imTOR podrían aportar ventajas sobre los ICN a nivel cardiovascular. Como hemos visto, los ICN (especialmente la CsA) pueden favorecer la HTA por vasoconstricción arteriolar y activación del eje renina-angiotensina, además de ejercer efectos directos sobre el aparato yuxtaglomerular e incrementar la reabsorción tubular de sodio¹¹¹.

La vía mTOR es una vía anabólica necesaria para el desarrollo embrionario cardíaco, la supervivencia del cardiomiocito y el mantenimiento post-natal de la estructura y función del corazón¹¹². Se han estudiado los efectos sobre la vía mTOR en ratones *knockout* sometidos a estrés cardiovascular tras ser modificados por ingeniería genética¹¹³. Con la vía mTOR activa se favoreció el desarrollo de hipertrofia cardíaca, el envejecimiento y la disfunción del órgano; en cambio, la inhibición de la vía mTOR con rapamicina (SRL) dio como resultado un aumento significativo de la supervivencia del animal.

La regresión de la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) tras tratamiento con imTOR se ha descrito en dos trabajos de Paoletti et al.: uno en pacientes tratados con SRL (13 casos y 23 controles)¹¹⁴, y otro tras conversión a EVL y dosis bajas de CsA (se randomizaron

30 pacientes, 10 conversiones)¹¹⁵. En ambas ocasiones, los receptores tratados con imTOR mostraron una disminución significativa de la masa ventricular izquierda, independiente de los cambios de presión arterial, a expensas de una reducción del grosor parietal del ventrículo izquierdo (VI). Sin embargo, estos hallazgos no han sido corroborados posteriormente en dos grandes ensayos clínicos. Uno de ellos, el estudio multicéntrico EVITA¹¹⁶, aleatorizó 71 receptores de TxR a mantener Tac frente a conversión a EVL (asociando ácido micofenólico ambas ramas). A los dos años, se observó una ligera disminución del índice de masa del VI en el grupo de imTOR, aunque sin diferencias significativas. Además, el grupo de conversión a EVL mostró mejoría en el filtrado glomerular ($p=0,03$). Posteriormente, el ensayo clínico de conversión temprana a everolimus ELEVATE¹⁰³, con más de 700 pacientes randomizados, tampoco evidenció reducción significativa de la masa del VI tras un seguimiento total de dos años.

Es conocido que los imTOR pueden promover el desarrollo de dos entidades relacionadas con la aterosclerosis como son la dislipemia¹¹⁷ y la diabetes postrasplante¹¹⁸. Sin embargo, independientemente del aumento de los niveles séricos de colesterol LDL, los imTOR también han mostrado varios efectos anti-ateroscleróticos en estudios experimentales: por un lado mejoran la función endotelial e inhiben la proliferación de células musculares lisas. Por otro, reducen el acúmulo lipídico en la placa de ateroma al disminuir el reclutamiento monocítico y al estimular la eliminación de colesterol del macrófago mediada por autofagia¹¹⁷. Por el contrario, el efecto diabetogénico de los imTOR parece basarse en una mayor resistencia a la insulina a nivel periférico, debido a depósitos ectópicos de triglicéridos^{117 119}, y a nivel hepático, con un menor control de la gluconeogénesis¹²⁰. También se ha observado una disminución de la secreción insulínica por efecto directo del imTOR sobre la célula beta pancreática^{118 121}. El riesgo de diabetes

post-tx se incrementa especialmente cuando se combina un ICN con un imTOR (incidencia descrita de hasta el 38%¹¹⁸). En el estudio CONVERT¹⁰⁴, el grupo convertido a SRL también mostró una mayor incidencia de hiperglucemia (11,3% vs. 6,6%, p=0,03). Sin embargo, otros datos en la literatura generan controversia acerca del riesgo diabetogénico de los imTOR respecto a otras pautas de inmunosupresión: en el estudio ORION¹²², los pacientes que recibían Tac (con o sin SRL) presentaron más diabetes post-tx que los tratados con SRL y MMF; y en un metaanálisis de Murakami et al.¹²³, la incidencia de diabetes de novo tras el trasplante fue similar en los tratados con imTOR frente a los controles con ICN (5,5% vs. 5,05%). Un factor de confusión puede ser la mayor dosis de corticoides recibida (en bolos o como tratamiento de mantenimiento) debido a la mayor incidencia de rechazo agudo biopsiado en pacientes tratados con imTOR^{124 125}.

2.4.3 Rol antitumoral de los imTOR

La vía mTOR está implicada muchas veces en los procesos de señalización de proliferación celular, reprogramación metabólica, angiogénesis y diseminación de la célula tumoral¹²⁶. Su inhibición, por tanto, podría tener un rol beneficioso desde el punto de vista oncológico⁷⁹. Esto se vio por primera vez en sarcomas de Kaposi diagnosticados en receptores de trasplante renal que regresaron completamente tras conversión de ICN a sirolimus¹²⁷.

Como se ha expuesto previamente, el tratamiento con ICN es un factor de riesgo, dosis-dependiente, de desarrollo de patología tumoral maligna en los receptores de órgano sólido^{85 128 129}. En contraposición, los imTOR, considerados como inhibidores de la señal de proliferación, han mostrado propiedades antioncogénicas en diferentes estudios *in*

vitro e *in vivo*¹³⁰. Citoquinas como la IL-2 y factores de crecimiento como el VEGF¹³¹, tras estimular la fosforilación de Akt por la PI3K (fosfatidil inositol 3-Kinasa), utilizan la vía mTOR para la activación celular. El gen PTEN (cromosoma 10), que expresa una fosfatasa y una tensina que regulan negativamente la ruta mTOR, se encuentra mutado en algunos tipos de neoplasia, dando lugar a un sobreestímulo de la vía mTOR que frena los mecanismos de apoptosis¹³⁰. La utilización de inhibidores mTOR puede evitar la actividad de estos oncogenes y puede frenar la respuesta anómala de crecimiento y expansión de las células cancerosas, aumentar su susceptibilidad a la apoptosis e interferir en la angiogénesis⁸¹.

Diferentes ensayos clínicos han mostrado una menor incidencia de cáncer en receptores de TxR tratados con imTOR, en comparación con los que utilizan ICN¹³². El imTOR ha demostrado ser factor de protección tumoral incluso en terapia combinada con ICN¹³⁰. Actualmente, además, forman parte del tratamiento de algunos tumores, como el cáncer renal o los angiomiolipomas asociados a la esclerosis tuberosa¹³³.

2.4.4 Rol antiviral de los imTOR

La vía mTOR, en especial la mTORC1, está implicada en procesos anabólicos de biogénesis mitocondrial y de síntesis proteica y lipídica. Concretamente, interviene en la translocación del ARN mensajero (ARNm) y en la elongación del proceso de traducción en el ribosoma; estos mecanismos celulares son utilizados por diversos virus, por lo que su inhibición puede interferir en la replicación viral¹³⁴.

Cuando se produce una infección vírica, se origina una primera “fase de expansión” clonal con una proliferación importante de linfocitos CD8; le sigue una “fase de contracción”, con apoptosis de la gran mayoría de células CD8 efectoras; y finalmente

una “fase de mantenimiento” en la que sobreviven y se renuevan células de memoria generadas a partir de una pequeña fracción de estos linfocitos CD8¹³⁵. En estudios experimentales¹³⁶, el empleo de rapamicina en “fase de expansión” ha conllevado un incremento notable del número generado de linfocitos CD8 de memoria, mientras que en “fase de contracción” mejoró la calidad de estas células, por lo que los imTOR pueden optimizar la respuesta inmune a ciertas vacunas¹³⁷.

La patología viral es relativamente frecuente en el receptor de órgano sólido. Los imTOR han demostrado tener un rol importante en el manejo del citomegalovirus (CMV). También hay datos en la literatura que apoyan su utilización en la infección por virus BK y en el sarcoma de Kaposi asociado a infección por herpesvirus 8. No hay evidencia, sin embargo, que apoye su uso frente a la replicación del virus de la hepatitis C ni en los trastornos linfoproliferativos mediados por el virus Epstein-Barr¹³⁸.

Citomegalovirus (CMV). Es un tipo de herpesvirus, común, de afectación típica en pacientes inmunocomprometidos y de difícil erradicación. Se caracteriza por estimular la producción de un análogo de la IL-10, la cual disminuye la respuesta inflamatoria e inmune del huésped con un descenso de la producción de factores proinflamatorios como IL-12 e interferón- γ (IFN- γ)¹³⁹. La inhibición de la ruta mTOR compensa estos mecanismos aumentando la producción de IL-12 (proinflamatoria) y disminuyendo la de IL-10 (antiinflamatoria)¹³⁴. Además, el bloqueo de la PI3K por la acción del imTOR también interfiere en la replicación viral del CMV. En un estudio experimental, Egli et al. observaron que la producción de IFN- γ por linfocitos T expuestos al antígeno pp65 del CMV se reducía a la mitad en presencia de niveles de tacrolimus (de 6 ng/mL) y no se modificaba al utilizar sirolimus¹⁴⁰. Por su parte, Havenith et al. llevaron a cabo un

ensayo clínico en pacientes trasplantados renales randomizados a recibir (además de corticoides) ciclosporina, everolimus o micofenolato. Estudiaron las células T CD8 específicas frente al CMV presentes de forma previa al trasplante y a la randomización. Los pacientes tratados con EVL y MMF presentaron un aumento de estas células, que fue especialmente marcado en el grupo de EVL; en cambio, no se detectaron modificaciones del recuento de CD8 en el grupo de CsA¹⁴¹. En otro estudio unicéntrico se randomizaron 288 trasplantados, de riesgo inmunológico bajo o moderado, a recibir Tac + EVL (e inducción con basiliximab o timoglobulina 3 mg/kg) o bien Tac + MMF (e inducción con basiliximab). Ningún paciente recibió profilaxis para CMV. La rama de EVL tuvo una incidencia menor de infección y enfermedad por CMV¹⁴².

En el metaanálisis publicado por Andrassy et al.¹⁴³, con revisión de múltiples ensayos clínicos, se evidenció que el tratamiento inmunosupresor con ICN incrementa el riesgo de infección por CMV en comparación con los protocolos basados en imTOR; la combinación de ambos también se mostró superior frente al tratamiento basado únicamente en ICN. Los imTOR, por tanto, han demostrado reducir en el paciente trasplantado la incidencia, severidad y recurrencia de infección por citomegalovirus¹⁴⁴.

Según las recomendaciones actuales, se acepta que el uso de imTOR de novo (combinado o no con ICN) puede hacer prescindible la profilaxis universal para CMV; en caso de que se utilice inmunoglobulina anti timocítica de inducción, el uso de imTOR de novo permite prescindir de la profilaxis con valganciclovir; y en los casos de alto riesgo de infección por CMV (donante positivo para IgG de CMV y receptor negativo) se recomienda el uso de imTOR de novo, estando la profilaxis obligada en caso contrario.

Virus BK (BKV). Patógeno de la familia de los poliomavirus, de carácter oportunista y muy ubicuo. Cuando ocasiona infección en el receptor de trasplante renal puede conducir a nefropatía e incluso a pérdida del injerto. La primoinfección ocurre con frecuencia en la primera década de vida: el virus coloniza el tracto urinario y queda en estado latente en el epitelio urotelial y tubular, siendo capaz de iniciar su replicación en situaciones de disminución de la inmunidad. Típicamente produce necrosis a nivel del túbulo distal, iniciando un proceso de daño e inflamación local; seguidamente da lugar a denudación del epitelio y disrupción de la membrana basal tubular, accediendo al intersticio y a los capilares peritubulares, pudiendo provocar viremia. Cuando ésta ocurre suele ser precoz: la mitad de las veces aparece durante los dos primeros meses postrasplante y el 95% durante los dos primeros años¹⁴⁵. Esta reactivación temprana del BKV se ha relacionado con diversos factores como son la intensidad del tratamiento inmunosupresor, lesiones tubulares producidas tras el daño de isquemia-reperfusión, o el trauma quirúrgico.

En cuanto a la inmunosupresión, la nefropatía por BK se ha relacionado con dosis y niveles elevados de tacrolimus¹⁴⁶. De hecho, su uso se ha mostrado como un factor de riesgo superior a recibir MMF¹⁴⁵ o CsA^{147 148}, e independiente de haber recibido tratamiento de episodios de rechazo o globulina anti-timocítica de inducción¹⁴⁷.

Actualmente, la única estrategia considerada eficaz para combatir la infección por el BKV consiste en disminuir la intensidad de la inmunosupresión¹⁴⁹. La minimización de dosis del MMF, por ejemplo, ha demostrado reducir la persistencia de la viremia aunque también aumenta el riesgo potencial de rechazo agudo¹⁵⁰. La vía mTOR es necesaria para la replicación del virus BK, que carece de ADN-polimerasa. Su inhibición puede tener un efecto beneficioso, y ha demostrado reducir (*in vitro* y de manera dosis-dependiente) la

expresión del antígeno T del virus¹⁵⁰, encargado de iniciar el ciclo celular del BKV. En otro estudio reportado por Egli et al.¹⁵¹, se evidenció que la respuesta de IFN- γ frente al antígeno T-largo del BKV disminuía en presencia de niveles de ICN (especialmente con Tac) y se mantenía estable con SRL. Por tanto, se han postulado distintas estrategias inmunosupresoras frente al BKV:

- Minimización del ICN¹⁵².
- Reducción o suspensión del antimetabolito asociado¹⁵³.
- Minimizar ambos (ICN y antimetabolito)¹⁵⁴.
- Cambio de tacrolimus por ciclosporina¹⁵³.
- Conversión de ICN a imTOR^{155 156}.

Nuestro grupo publicó una serie de 15 trasplantados con infección por BKV¹⁵⁶. En 8 casos se redujo la inmunosupresión (7 de ellos recibieron además cidofovir y 6 inmunoglobulina intravenosa) y los 7 restantes fueron convertidos a imTOR (suspendiendo el ICN o el antimetabolito); los pacientes convertidos presentaron un descenso más rápido de la viremia así como mejoría de la función renal, sin constatarse episodios de rechazo agudo. Otro estudio randomizado en 40 pacientes con viremia o viruria $\geq 10^6$ copias/ mL mostró mayor tendencia al aclaramiento del BKV en los pacientes convertidos a EVL (con suspensión de MMF) frente a los que redujeron la dosis de MMF al 50%¹⁵⁰. Se han estudiado otros tratamientos como el levofloxacino, probado sin éxito en dos ensayos clínicos para prevenir y tratar la nefropatía por BKV^{157 158}. También se realizó un ensayo clínico con el inmunosupresor FK778, un derivado del metabolito activo de la leflunomida, que, aunque logró reducciones de la viremia, obtuvo malos resultados en cuanto a función renal y rechazo del injerto¹⁵⁹.

En cuanto a estrategias preventivas, un ensayo de Brennan et al.¹⁴⁷ en el que se randomizaron 200 trasplantados, mostró al año mayor incidencia de viruria de BKV en los pacientes tratados con Tac y MMF (46%) comparado con la pauta de CsA y MMF (13%, $p=0,005$). En 2017 se publicaron los resultados de un ensayo clínico multicéntrico danés¹⁶⁰, que randomizó 224 pacientes al sexto mes post-tx a recibir (además de prednisona) CsA, EVL o ácido micofenólico (AMF). Se reportó una incidencia de viruria mayor en la rama tratada con AMF (43,6%, frente al 16,9% con CsA y el 19,8% con EVL) y se diagnosticaron tres casos de nefropatía BK en el grupo de AMF, aunque no se encontraron diferencias significativas en cuanto a viremia. El grupo de CsA sí mostró un aclaramiento de la viruria significativamente más rápido y menor riesgo de nefropatía BK que el grupo de AMF.

Otros ensayos clínicos, con objetivos primarios no relacionados con el virus BK, han arrojado datos favorables a la utilización del imTOR: menor incidencia de infección por BKV con EVL, y menor riesgo también de infección con la combinación de EVL y dosis reducidas de CsA en comparación con el tratamiento Tac-MMF^{142 161 162}. Además, un análisis a partir de la base de datos UNOS (*United Network for Organ Sharing*)¹⁶³ describió un 30% menos de riesgo de nefropatía BK asociado al uso de fármacos imTOR. Sin embargo, esto no ha sido corroborado en un metaanálisis que comparó los regímenes terapéuticos basados en imTOR vs. ICN, no evidenciando efecto protector de los primeros frente al BKV¹⁶⁴. Por tanto, aunque puede considerarse la conversión a imTOR en pacientes con viruria, viremia o nefropatía BK¹³⁴, actualmente continúa vigente como principal recomendación reducir la intensidad de la inmunosupresión cuando la viremia sobrepase las 10^3 copias/ mL²⁸.

Virus Epstein-Barr (VEB). Es un tipo de herpesvirus que produce desde viremia asintomática a cuadros mononucleósidos, además de poder originar, en el receptor de órgano sólido, trastornos linfoproliferativos postrasplante (PTLD). El riesgo es mayor cuando el donante es seropositivo para VEB y el receptor negativo¹⁶⁵.

Para tratar la PTLD, además de rituximab o quimioterápicos, es preciso disminuir la inmunosupresión. En la literatura hay controversia acerca del beneficio aportado por la conversión a imTOR^{134 166 167}. En algunos registros se describe un riesgo menor de PTLD utilizando combinaciones de CsA con MMF o un imTOR (comparado con la combinación Tac-MMF). Sin embargo, en la serie reportada por Sampaio et al.¹⁶⁷, la asociación de imTOR y Tac conllevó un riesgo mayor de PTLD en receptores negativos para VEB. Aunque el uso de imTOR de novo no ha demostrado prevenir la aparición de la PTLD asociada al VEB, la conversión posterior al diagnóstico de PTLD sí podría mejorar la supervivencia de estos pacientes¹³⁴.

Herpesvirus humano 8 (HVH8). En el paciente trasplantado, la infección por este virus se asocia a neoplasias como el sarcoma de Kaposi. Éste suele expresarse como múltiples lesiones vasculares cutáneas y mucosas, pudiendo asociar afectación visceral e incluso del injerto. La seroprevalencia del HVH8 varía notablemente en función de la zona geográfica, siendo muy frecuente en algunas regiones africanas. En cuanto a su tratamiento, dos series publicadas de 15 y 10 pacientes en los que se realizaba conversión (de ICN y MMF a sirolimus) mostraron resultados notablemente exitosos en cuanto a resolución completa del sarcoma de Kaposi^{127 168}, por lo que la conversión a imTOR se considera de elección^{134 138}.

2.5 Efectos secundarios de los ImTOR. Proteinuria.

2.5.1 Toxicidad de los imTOR

La vía m-TOR está implicada en diferentes procesos anabólicos de síntesis de proteínas, nucleótidos y lípidos. Su inhibición puede asociar la aparición de ciertos efectos secundarios leves como citopenias, retrasos en la cicatrización de las heridas o linfocitos; y otros potencialmente más graves como proteinuria, alteraciones en el control metabólico y neumonitis intersticial¹⁶⁹. Según la gran mayoría de los estudios realizados, al menos un 20-30% de los pacientes tratados con imTOR deben suspender el tratamiento debido a reacciones adversas^{101 103 104 170}. La mayor parte de estos efectos secundarios son dosis-dependiente y algunos factores pueden favorecer su aparición, como la comorbilidad del enfermo, el tratamiento asociado y el momento post-tx de inicio del fármaco; por ello, es importante la individualización de la prescripción y su monitorización.

En el campo del trasplante renal, se acepta el uso de imTOR generalmente en conversión temprana o bien de novo a dosis bajas. La conversión tardía sólo se recomienda en casos de cáncer de piel no melanocítico, infecciones refractarias por CMV o BKV y en la PTLN asociada al VEB, siempre que la TFG sea superior a 40 mL/min y la proteinuria en 24 horas inferior a 1 gramo¹⁶⁹. Los primeros estudios que evidenciaron múltiples efectos adversos de los imTOR fueron realizados con niveles plasmáticos valle relativamente altos. Sin embargo, el empleo de dosis bajas con el objetivo de minimizar las reacciones adversas no siempre es una estrategia adecuada. En el estudio *Symphony*, la utilización de imTOR de novo (a dosis bajas) como alternativa a los ICN se correlacionó con mayor

incidencia de rechazo agudo biopsiado y menor supervivencia del injerto respecto a los trasplantados tratados con Tac¹²⁴.

2.5.2 Efectos secundarios de los imTOR

Se han descrito múltiples efectos o reacciones adversas en relación al tratamiento con imTOR; los más característicos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3 Efectos adversos del tratamiento con imTOR.

Efecto adverso (incidencia %)	
Retraso en la cicatrización (11-28%)	Anemia
Linfoceles (6-12%)	Hiperlipidemia (5-74%)
Edema (8-32%)	Diabetes mellitus (5,5-11%)
Angioedema (2-15%)	Proteinuria (10-30%)
Estomatitis y aftas orales (3-19%)	Microangiopatía trombótica
Dermatitis, foliculitis tipo acné (13-46%)	Neumonitis intersticial (5-39%)

La interferencia en el proceso de cicatrización es, junto a la formación de linfoceles, uno de los efectos de clase, no dosis-dependiente, más típicos. Está mediada por la inhibición de la angiogénesis dependiente del VEGF¹⁷¹ y una disminución de la actividad del fibroblasto¹⁷². La obesidad y la diabetes también pueden favorecer este retraso en la cicatrización de heridas. En cuanto a los linfoceles, han mostrado una incidencia de hasta el 52% en estudios retrospectivos¹⁷³, aunque rara vez constituyen la causa de suspensión del imTOR.

El edema es otro efecto secundario que aparece con relativa frecuencia. Los imTOR reducen la expresión de cadherina-VE¹⁷⁴ y podrían estimular la liberación de prostaciclina endotelial¹⁷⁵, favoreciendo la vasodilatación y un aumento de la permeabilidad capilar.

La inhibición del VEGF también interfiere en la linfangiogénesis¹⁷⁶, pudiendo contribuir al edema, muchas veces localizado o relacionado con intervenciones quirúrgicas. Reducir los niveles valle del imTOR puede contribuir a controlar el edema; el beneficio de los diuréticos, en cambio, es limitado.

Entre los efectos secundarios potencialmente más graves se encuentran la hiperlipidemia (en especial la hipertrigliceridemia), la diabetes mellitus de nueva aparición postrasplante (ya comentada previamente), la neumonitis intersticial, la microangiopatía trombótica y la proteinuria, que veremos en el siguiente apartado.

La neumonitis intersticial por imTOR ocurre con más frecuencia en los primeros 2-6 meses de tratamiento¹⁷⁷. Su fisiopatología no se conoce con claridad. Se ha postulado un mecanismo inmunoalérgico por el que el imTOR induciría la autofagia celular y facilitaría la exposición antigénica a nivel de la célula endotelial alveolar y el desarrollo de alveolitis linfocitaria¹⁷⁸. También se han propuesto mecanismos de toxicidad directa del imTOR, dosis-dependientes, apoyados por la rápida respuesta a la suspensión del fármaco evidenciada en muchas ocasiones¹⁷⁹. El diagnóstico de neumonitis, en general, implica la suspensión del fármaco y el tratamiento con dosis altas de corticoides.

2.5.3 Proteinuria como efecto secundario de los imTOR

A nivel general, los factores predictivos más importantes de progresión de la ERC al estadio terminal son el grado de proteinuria y el daño crónico a nivel túbulo-intersticial¹⁸⁰

^{181 182}.

Entre el 35% y el 45% de los receptores de trasplante renal presentan proteinuria durante el primer año de trasplante¹⁸³. En la mayoría de ocasiones se trata de una excreción proteica urinaria de bajo grado, con frecuencia inferior a los 500 mg diarios. Sin embargo,

incluso a niveles bajos la proteinuria se asocia a una menor supervivencia del injerto independientemente de otros factores de riesgo como la función renal, la edad del receptor, los episodios de rechazo agudo y la presencia de daño glomerular en la biopsia¹⁸⁰. La proteinuria también constituye un factor de riesgo independiente de menor supervivencia del receptor¹⁸⁴, como se describe en un estudio retrospectivo de Fernández-Fresnedo et al., en 3.365 trasplantados renales. Los pacientes proteinúricos mostraron un riesgo relativo más elevado de fallo del injerto y de muerte, tanto de tipo cardiovascular como por cualquier causa¹⁸⁵.

Se ha descrito en diversos estudios la aparición de proteinuria, incluso en rango nefrótico, después de realizar conversión de tratamiento de ICN a un imTOR^{186 187 188 189}. En el estudio ZEUS¹⁶¹, 155 pacientes de un total de 300 fueron convertidos de CsA a tratamiento basado con everolimus. Al año, el grupo de EVL presentaba mejor TFG (72 vs 61 ml/min, $p < 0,0001$) pero también mayor proteinuria: media de 455 ± 510 vs. 284 ± 472 mg/día en la rama tratada con CsA. En el estudio CONVERT¹⁰⁴, la rama tratada con SRL experimentó un aumento de proteinuria de 0,35 a 0,87 g/día a los 2 años de conversión (vs. 0,28 a 0,48 g/día con ICN, $p < 0,001$), y los no proteinúricos de base aumentaron de 0,04 a 0,72 g/día (vs. 0,05 a 0,22 g/día con ICN, $p < 0,001$). Se obtuvieron resultados en la misma línea en el ensayo clínico ELEVATE, de Fijter et al.¹⁰³, con un cociente urinario proteína/creatinina a los 2 años de $36,4 \pm 53,4$ en la rama de EVL vs. $19,1 \pm 26,9$ en la rama de ICN ($p < 0,001$); y se reportó proteinuria como efecto adverso en el 15,3% de los pacientes tratados con EVL (vs. sólo un 3,6% en la rama de ICN). Aunque no ha sido el objetivo principal de estos estudios, en otros ensayos clínicos se ha reportado proteinuria como aparición de novo en un 10,1% de los pacientes tratados con imTOR⁹⁸, como efecto adverso en hasta el 29,7%⁹⁶, e incluso como causa de discontinuación del tratamiento¹⁰².

El momento post-tx en el que se realiza la conversión también puede influir en la aparición de proteinuria y su relevancia clínica. En un estudio retrospectivo de Sánchez-Fructuoso et al.¹⁰⁹, realizado en 220 pacientes trasplantados, la mediana de proteinuria basal aumentó de 304 a 458 mg/día al año de la conversión a EVL. La proteinuria basal superior a 550 mg/día fue factor de riesgo de pérdida del injerto sólo en los pacientes convertidos después del tercer año de trasplante.

En cuanto a la fisiopatogenia, uno de los mecanismos que puede explicar la aparición de proteinuria en el contexto de conversión a imTOR es el cese del efecto vasoconstrictor de los ICN. Se han descrito, de hecho, una serie de cambios en la hemodinámica renal que tienen lugar tras la suspensión de estos fármacos¹⁹⁰: en primer lugar aumenta la presión intraglomerular debido a un incremento del flujo sanguíneo renal y a una disminución de la resistencia en la arteriola aferente; en segundo lugar, se ha objetivado cierta pérdida de la reserva funcional renal que se traduce en una situación de hiperfiltración. Se ha sugerido también que los ICN podrían estar enmascarando una alteración en la permeabilidad glomerular en un injerto disfuncionante o con daño preestablecido a nivel de la pared capilar glomerular. Sin embargo, la retirada del ICN no parece justificar por sí sola, ni en todos los casos, el desarrollo de proteinuria. Por un lado, se ha observado aparición de proteinuria post-conversión, incluso en rango nefrótico, en receptores de trasplante que no presentaban proteinuria preexistente ni lesiones glomerulares en la biopsia¹⁹¹. También se han descrito aumentos reversibles de proteinuria tras conversión de azatioprina a SRL¹⁹², sin la influencia por tanto de la retirada de un ICN.

El uso de protocolos inmunosupresores con imTOR de novo también se ha asociado a aparición de proteinuria. En un estudio realizado por Büchler et al.¹⁹³ se randomizaron

145 pacientes trasplantados renales tratados con globulina anti-timocítica, micofenolato y esteroides a recibir CsA o SRL. No se evidenciaron diferencias en cuanto a la supervivencia renal y/o del paciente, pero al año sí se encontró una incidencia de proteinuria (definida como más de 0,5 g/día) mayor en el brazo tratado con imTOR: 38,8% vs. 5,6% ($p<0,001$). Además, aproximadamente un 28% de los sujetos discontinuaron la toma de SRL por efectos adversos. Se encontraron resultados similares en otro ensayo prospectivo y aleatorizado de Glotz et al.¹⁹⁴, en 141 pacientes, que comparaba un protocolo de inducción con timoglobulina y SRL de novo frente a otro con Tac y administración de timoglobulina sólo en los casos de retraso en la función del injerto. Al año, un 36% de los sujetos de la rama de imTOR presentaban una proteinuria de más de medio gramo al día frente a un 14% en el grupo tratado con Tac ($p=0,03$). Por tanto, además de considerar los cambios hemodinámicos que se producen tras la retirada de un ICN, conviene investigar la implicación de efectos específicos de los imTOR en la etiopatogenia de la proteinuria del paciente trasplantado.

Se conocen algunos factores de riesgo de desarrollo de proteinuria tras conversión a terapia con imTOR en el trasplante renal. Los más relevantes son la existencia de proteinuria significativa o de un filtrado glomerular disminuido, ambos en el momento basal o previo a la conversión¹¹⁰. La hipercolesterolemia y la obesidad también se han descrito como factores predictores de desarrollo de proteinuria en estos pacientes^{195 196}. A nivel general, en un estudio retrospectivo de más de 4.000 sujetos se observó que es concretamente la hipertrigliceridemia, y no la hipercolesterolemia, el factor predictor de riesgo de proteinuria¹⁹⁷. A pesar de ello, los posibles mecanismos patogénicos no están claros y continúan siendo objeto de investigación^{190 198 199}. En el ensayo CONVERT¹⁰⁴ se encontró que la proteinuria inducida tras la introducción de SRL mostraba una

distribución “no normal” en la población trasplantada; es posible, por tanto, que solo los sujetos que presenten cierto sustrato genotípico o fenotípico sean susceptibles de desarrollar esta complicación.

2.6 Daño renal y proteinuria mediados por los ImTOR y rol del VEGF.

Cualquier insulto sobre el riñón trasplantado, inmunológico o no, produce una respuesta adaptativa del tejido renal. Esta respuesta adaptativa es importante, ya que condiciona en gran parte el daño que se establece en el injerto y el impacto sobre su supervivencia a largo plazo.

Se ha descrito que donantes de riñón con una base genética asociada a una expresión elevada de hemo oxigenasa 1 (HO-1), proteína con un rol citoprotector importante, presentan una supervivencia del injerto significativamente mejor que los riñones de donantes genéticamente “bajos productores” de HO-1²⁰⁰. También se ha sugerido que ciertos genes, como el A20, pueden tener una influencia primordial en la respuesta adaptativa del órgano trasplantado^{201 202 203}.

El *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) es otro factor importante implicado en la respuesta adaptativa, y actualmente se cree que tiene un rol clave en la fisiopatogenia de la proteinuria asociada al tratamiento imTOR¹⁹⁸. El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específico para las células endoteliales. A nivel renal, las células podocitarias sintetizan las isoformas A y C del factor, que actúan de manera autocrina y paracrina promoviendo la supervivencia de los propios podocitos y de las células endoteliales. El VEGF también es esencial para activar las cascadas de

señalización de los podocitos y estimular la interacción entre la podocina, que forma parte de la membrana de filtración, y el CD2AP, proteína fundamental en la estructura del diafragma de hendidura^{204 205} (**Figura 1**).

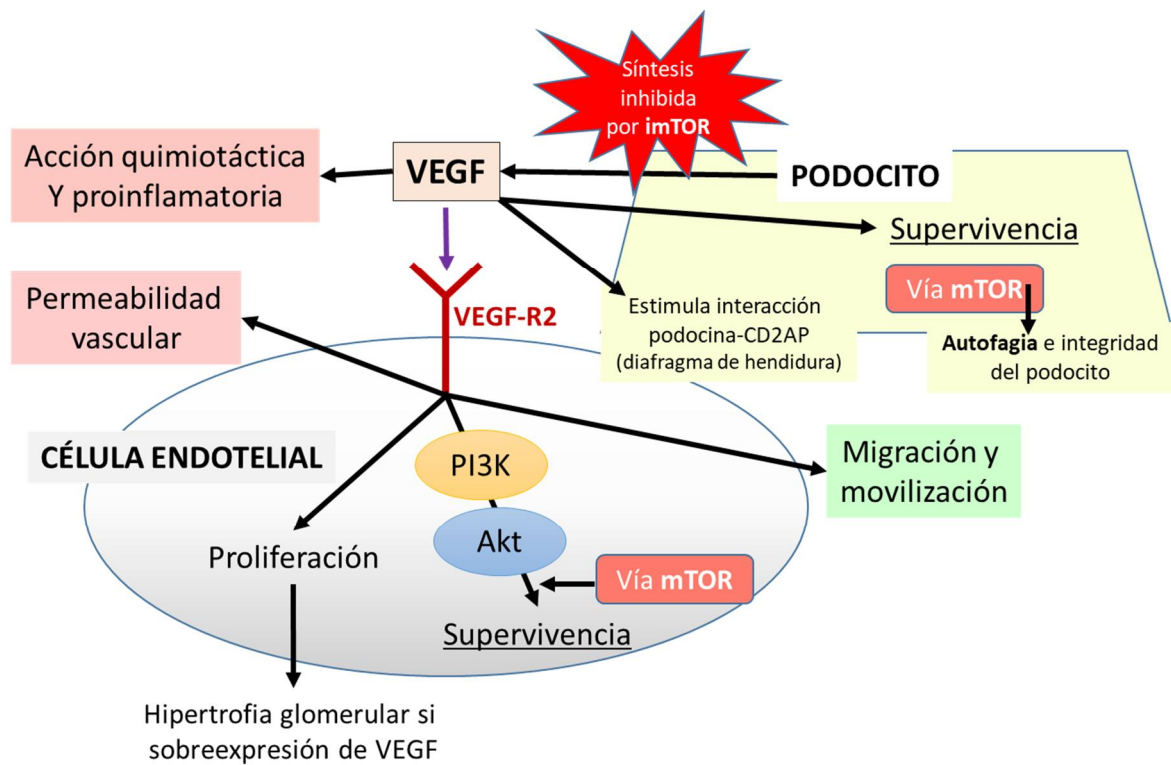


Figura 1. *Acciones del VEGF en las células endoteliales y los podocitos.*

Los mTOR, por su parte, actúan disminuyendo la producción del VEGF e inhibiendo la estimulación mediada por su receptor en el endotelio vascular⁸¹. El VEGF tiene un rol crucial en la preservación y reparación tanto de las células endoteliales glomerulares como de los capilares peritubulares, por lo que constituye en potencia un factor protector eficaz frente a la progresión de la enfermedad renal^{206 207 208}. En modelos experimentales de progresión de enfermedad renal en ratas (modelo de riñón remanente), el desarrollo de glomerulosclerosis y AT se correlacionó con la pérdida de capilares peritubulares y una

disminución de la expresión del VEGF a ese nivel. El daño renal estaría mediado, en parte, por una alteración en la angiogénesis²⁰⁸. En otro estudio, la administración de VEGF a ratas parcialmente nefrectomizadas redujo la FI, evidenciándose menor depósito de colágeno tipo III, y frenó el deterioro progresivo de la función renal²⁰⁹. También redujo el daño generado en las células epiteliales tubulares, manifestado por una menor expresión de osteopontina (glicoproteína asociada al desarrollo de fibrosis del parénquima)^{210 211}. A nivel histológico, las ratas tratadas con VEGF mostraron una proliferación endotelial mayor a nivel de los capilares peritubulares y glomerulares y una menor rarefacción capilar peritubular. Estos hallazgos se correlacionaron con un incremento en la expresión de la NO sintasa en el endotelio y presencia de mayores concentraciones de nitratos y nitritos en orina²⁰⁹. Por otra parte, se ha descrito que el VEGF ejerce un efecto pro supervivencia de la célula epitelial tubular frente al efecto citotóxico de la CsA²¹². También ha demostrado, junto a la HO-1, tener un papel importante en la respuesta adaptativa tras el daño de isquemia-reperfusión desencadenado en el proceso de TxR de donante cadáver. En una investigación de Lemos et al., una expresión baja del ARNm tanto del VEGF como de la HO-1 se correlacionó con peor función renal a la semana del implante²¹³.

El VEGF es un mediador clave de la angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas, y su función es esencial para mantener la integridad de la vasculatura renal²¹⁴. Sin embargo, se han descrito otros efectos deletéreos del VEGF que pueden jugar un papel en la progresión de la ERC: a nivel hemodinámico puede incrementar el flujo sanguíneo renal y puede aumentar la permeabilidad glomerular. A nivel podocitario, su sobreexpresión puede favorecer la hipertrofia glomerular (con excesiva proliferación endotelial y mesangial) y el desarrollo de glomeruloesclerosis asociada a proteinuria

progresiva²¹⁵. Por otra parte tiene acción quimiotáctica: es capaz de amplificar la reacción inflamatoria a nivel tisular, facilitando la adhesión y migración de los leucocitos a través del endotelio; y puede promover el desarrollo de aterosclerosis²⁰⁶.

2.7 Gen del VEGF: importancia de sus polimorfismos.

El gen que codifica el VEGF está localizado en seres humanos en el cromosoma 6p21.3, y está organizado en 8 exones separados por 7 intrones²¹⁶. Es un gen elevadamente polimórfico: en la literatura se han descrito más de 100 polimorfismos de nucleótidos simples (*single-nucleotide polymorphism* o SNP)^{217 218 219 220 221 222}. Algunos de estos SNP pueden asociar una producción proteica del VEGF aumentada o disminuida²²³. Por ello, son especialmente interesantes los SNP localizados en regiones reguladoras que modulan directamente su expresión génica. Un polimorfismo estudiado en diversas áreas de la Medicina es el SNP +936, situado en la región 3' no traducida; cuando esta localización del gen presenta un cambio de Citosina por Timina se produce una variante génica que carece de sitio potencial de unión para el factor de transcripción AP-4 (*activator protein 4*). Esta variante se correlaciona con niveles plasmáticos del VEGF inferiores en humanos sanos²¹⁷. Otros SNP de interés, presentes en la literatura científica, son los localizados en -1154 (G>A) y en -2578 (C>A), ambos pertenecientes a la región promotora del gen. Se ha reportado en algunas investigaciones asociación entre estos polimorfismos funcionales del VEGF y resultados clínicos del TxR en cuanto a supervivencia del injerto y en cuanto a eventos de rechazo agudo^{218 219 220}. En el trabajo de Shahbazi et al., realizado en 173 receptores de TxR, se encontraron niveles plasmáticos elevados del VEGF asociados a la presencia de los alelos G en el nucleótido -1154 y C

en el -2578. Para ello realizaron una comparativa midiendo *in vitro* la expresión del factor en células mononucleares de sangre periférica de 30 sujetos sanos que ejercieron de controles. Describieron también que los portadores de los alelos -1154G (ya sean G/A u homocigotos G/G) y -2578C (C/A y homocigotos C/C) asociaron un riesgo significativamente mayor de rechazo agudo los primeros 3 meses post-tx. Estos pacientes con mayor riesgo de rechazo prácticamente coincidieron con los altos productores de VEGF, que fueron principalmente los portadores del alelo -1154G y los homocigotos -2578 C/C. La tasa de rechazo agudo reportada fue de un 39% aproximadamente, con una mediana de tiempo post-tx de aparición del primer episodio de 14 días. Por su parte, Lemos et al.²¹⁹ determinaron los polimorfismos del VEGF en 306 donantes y 387 receptores de injerto renal. A diferencia del trabajo anteriormente mencionado no observaron asociación entre los SNP del VEGF y la incidencia de rechazo agudo. En cambio, sí encontraron que los individuos homocigotos para el alelo A en el sitio -2578 se mostraron como bajos productores de VEGF y además se asociaron llamativamente a una supervivencia del injerto inferior. El análisis multivariante concluyó que la ausencia del alelo -2578C (sujetos homocigotos A/A) fue un factor de riesgo de fallo del injerto independiente de los efectos derivados de la edad y el tipo de donante, la raza del receptor, el tiempo de isquemia fría, y el número de antígenos HLA del donante no compartidos por el receptor. Por otra parte, se evaluaron también los SNP del donante y del receptor en los sitios -7 y -1154, además del -2578 del donante, pero no se encontraron otras correlaciones con la supervivencia del injerto. Los autores concluyeron, por tanto, que los pacientes portadores de -2578 A/A son más vulnerables al daño tisular. Por el contrario, en el estudio reportado por Shahbazi²¹⁸ se habían descrito resultados en cierto modo contrapuestos: los portadores de -1154G y -2578C eran los que presentaban mayor riesgo

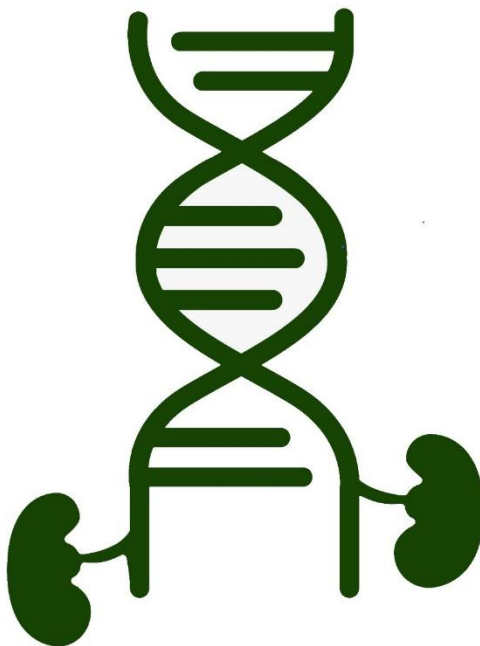
de rechazo frente a los receptores homocigotos -2578 A/A, que mostraron mejores resultados en ese sentido. Las notables diferencias entre ambos trabajos, sobre todo en lo que respecta a los portadores del alelo -2578A, podrían explicarse en base a las distintas tasas de rechazo agudo descritas respectivamente, a su vez en probable relación con la utilización de protocolos de inmunosupresión diferentes. Hay que destacar que el estudio de Lemos evaluó las secuencias genómicas de donantes y receptores, aunque sólo encontró relación con la supervivencia del injerto con los polimorfismos de estos últimos. Esto sugiere que las células derivadas del receptor constituyen una fuente importante de VEGF en el riñón trasplantado. Los linfocitos T, los monocitos y las plaquetas son ejemplos de células circulantes del torrente sanguíneo con capacidad para transportar y liberar el VEGF hasta el endotelio vascular, donde están situados sus receptores^{224 225 226}. Sin embargo, no se conoce con claridad el rol del VEGF (producido por las células del receptor) sobre el injerto renal. Se ha observado que la producción de VEGF por monocitos estimulados por el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos, así como la secundaria a la agregación plaquetaria, está implicada en el proceso de reparación tisular, especialmente en el de la célula endotelial²²⁴.

En otro trabajo más reciente, reportado por Gunesacar et al.²²⁰, se analizaron los polimorfismos del gen del VEGF en 290 pacientes trasplantados renales normofuncionantes y sin episodios de rechazo agudo durante el primer año de trasplante. Fueron comparados con 265 receptores con fallo del injerto y 187 controles sanos. Se observó una frecuencia significativamente mayor de portadores del alelo +936T entre los pacientes con excelente evolución de la función renal (19,0% con C/T y 20,7% homocigotos T) comparado con los que habían sufrido pérdida del injerto (11,7% con C/T y 12,8% homocigotos T, siendo $p=0,019$ y $p=0,017$ respectivamente).

En síntesis, el VEGF puede tener un rol protector o dañino sobre el riñón trasplantado en función de ciertos condicionantes, que podrían incluir el sustrato genético del paciente, los episodios de rechazo agudo y el tratamiento con imTOR. El objetivo principal de esta investigación es estudiar si algún polimorfismo del gen del VEGF puede comportarse como factor de protección o de riesgo de desarrollo de proteinuria (y de progresión del daño renal) cuando se utiliza este tipo de inmunosupresor. El conocimiento del comportamiento de estos polimorfismos permitiría prever el efecto del fármaco y ayudaría a individualizar su prescripción. Analizamos para ello los SNP -1154, -2578 y +936 del receptor, dada la relación directa entre éstos y la producción del VEGF, y las implicaciones descritas en el campo del trasplante renal.

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS



3 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

3.1.1 Importancia de la Farmacogenética

La Farmacogenética es la disciplina que estudia los efectos producidos por la variabilidad genética de cada individuo en respuesta a la administración de un fármaco. Actualmente constituye una herramienta importante para la individualización del tratamiento inmunosupresor en el paciente trasplantado renal. De hecho, en los últimos 10 años se han realizado investigaciones sobre polimorfismos de enzimas metabolizadoras de fármacos inmunosupresores, como el localizado en el gen CYP3A5, importante en el metabolismo del tacrolimus. Estos hallazgos se han podido implementar posteriormente en la práctica clínica, siendo de gran utilidad para la dosificación de ciertos fármacos que muchas veces tienen un margen terapéutico estrecho.

La Farmacogenómica, por otro lado, es la ciencia que estudia las bases genéticas y moleculares de las enfermedades con el fin de encontrar nuevos tratamientos. En nuestro trabajo estudiamos un contexto clínico como es el inicio de inhibidores de mTOR en pacientes trasplantados. Los efectos producidos por estos fármacos en la práctica clínica pueden ser muy diferentes en dos pacientes sometidos a factores externos similares. Creemos por tanto, que los estudios de farmacogenética nos pueden ayudar a comprender por qué se producen diferentes respuestas secundarias a un tratamiento.

3.1.2 Importancia clínica del estudio

En el campo del trasplante renal aún no se ha encontrado la estrategia inmunosupresora ideal para conseguir una supervivencia del injerto óptima y prolongada a largo plazo. Los inhibidores de la calcineurina (ICN) continúan siendo la base de este tratamiento gracias a su gran potencia inmunosupresora. Sin embargo, son fármacos con efectos potencialmente deletéreos sobre el receptor de trasplante renal, como son un aumento del riesgo cardiovascular, ya elevado *per se* en estos pacientes, y del riesgo tumoral, favorecido por la pérdida de vigilancia inmune y las infecciones por virus oncogénicos. Estos efectos perjudiciales, unidos al carácter nefrotóxico de estos fármacos, contribuyen a limitar la supervivencia tanto del riñón trasplantado a largo plazo como del propio paciente.

Los fármacos inhibidores de la vía m-TOR (imTOR) constituyen actualmente la alternativa a los ICN más eficaz y utilizada en el trasplante renal. No han demostrado superioridad frente a los ICN, entre otras cosas porque asocian mayores tasas de rechazo agudo, aparición de anticuerpos donante-específicos y desarrollo de rechazo crónico mediado por anticuerpos, que es una de las principales causas de pérdida del injerto. A pesar de esto, han demostrado su utilidad en ciertos contextos en los que se requiere evitar el fármaco ICN, por sus propiedades antitumorales o los beneficios que aporta frente a algunas infecciones virales típicas del post-trasplante, como el citomegalovirus o el virus BK.

La utilización de los imTOR en terapia de conversión es compleja, no sólo por su menor potencia inmunosupresora, sino porque además son drogas con un perfil notable de efectos secundarios que con relativa frecuencia obligan a suspender el tratamiento. Es

conveniente, por tanto, conocer qué pacientes tienen un perfil favorable para una conversión a imTOR exitosa.

La proteinuria es uno de los problemas de importancia que puede aparecer durante el tratamiento con imTOR. Es conocida su relevancia clínica en cuanto a peor supervivencia del injerto, e incluso del paciente, por lo que sería de gran utilidad poder predecir qué enfermos presentan un mayor riesgo de desarrollarla al recibir este tratamiento.

El VEGF es un factor de crecimiento involucrado en el mantenimiento y función tanto de los podocitos como de las células endoteliales glomerulares, actuando a través de la vía Akt-PI3K-mTOR. Dado que los fármacos imTOR disminuyen su producción y actividad, se ha postulado que el VEGF pueda estar implicado en el daño renal glomerular inducido por éstos. Su gen es elevadamente polimórfico, con más de 100 *Single Nucleotide Polymorphisms* descritos en la literatura. Algunos de estos polimorfismos (-2578 C>A, -1154 G>A, -936 C>T) influyen en la actividad transcripcional y se han relacionado con una producción proteica alterada del VEGF, e incluso con diferentes resultados clínicos en el trasplante renal.

La proteinuria asociada a los imTOR, y mediada probablemente por un déficit de actividad del VEGF, parece ocurrir sólo en determinados sujetos. Por tanto, es posible que el sustrato genético del paciente trasplantado sea el que determine si es susceptible o no de desarrollarla. Podríamos predefinir, en ese caso, si el inicio de tratamiento con un imTOR puede tener un pronóstico favorable o de riesgo en función de las características genéticas del paciente.

3.2 Hipótesis

Los pacientes trasplantados renales que presentan polimorfismos genéticos asociados a una producción alterada del VEGF pueden tener una probabilidad diferente de desarrollar proteinuria cuando son tratados con fármacos imTOR.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo principal del estudio

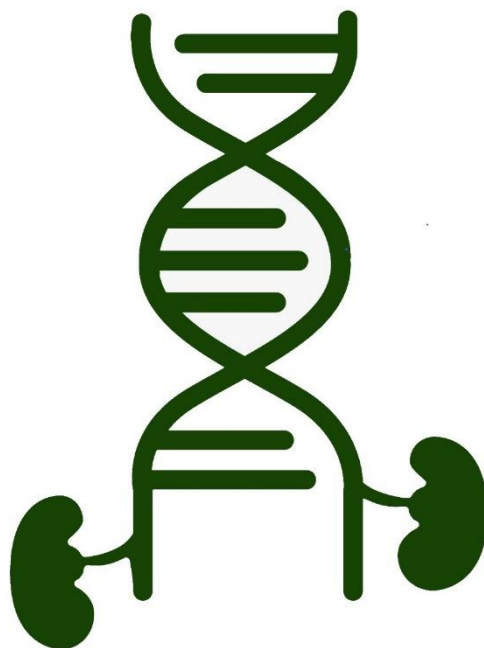
- Analizar si los polimorfismos -2578 C>A, -1154 G>A y -936 C>T del gen del VEGF pueden influir en el desarrollo de proteinuria en el paciente trasplantado renal tras iniciar tratamiento con un inhibidor mTOR (imTOR) a partir del tercer mes post-trasplante, ya sea como conversión (de inhibidor de la calcineurina [ICN] a imTOR) o en combinación con un ICN.

3.3.2 Objetivos secundarios del estudio

- Estudiar la incidencia de los polimorfismos de un nucleótido del gen del VEGF (-2578C>A, -1154G>A, -936C>T) en las poblaciones de pacientes trasplantados renales del Hospital Clínico San Carlos (Madrid) y del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander).
- Estudiar la evolución de la función renal y de la proteinuria en los pacientes convertidos a imTOR en función de los SNP del VEGF analizados.
- Estudiar los factores predictores de desarrollo o aumento de proteinuria tras el inicio o la conversión a un tratamiento imTOR a partir del tercer mes post-trasplante.

- Estudiar, durante el tiempo de seguimiento del estudio, el impacto de la proteinuria en cuanto a supervivencia del injerto renal y del paciente trasplantado a corto plazo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS



4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio observacional retrospectivo realizado en dos cohortes de pacientes trasplantados renales pertenecientes al Hospital Clínico San Carlos (Madrid) y al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) a partir de una base de datos prospectiva. Los Servicios de Nefrología de estos hospitales comenzaron a trabajar en conjunto desde la introducción de los inhibidores mTOR (imTOR) en España, por lo que las pautas e indicaciones de conversión o inicio de imTOR fueron homogéneas entre ambos.

La variable resultado principal del estudio fue la proteinuria al año de tratamiento con imTOR. Para realizar el análisis estadístico en función a esta variable, se realizó previamente un análisis de frecuencias para establecer un punto de corte con significado clínico y poder categorizar esta variable como cualitativa dicotómica.

4.2 Población a estudio

Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen a población de parte del centro y del norte de España. Esto se debe a que durante los años en los que se han realizado los trasplantes renales de los sujetos estudiados, el Hospital Clínico San Carlos (Madrid) fue Centro trasplantador de referencia para parte de Castilla la Mancha y Extremadura, mientras que el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) lo fue de La Rioja y parte de Castilla y León.

Para el estudio se incluyeron todos los pacientes trasplantados renales de ambas cohortes a los que se introdujo tratamiento con un imTOR entre octubre de 1999 y diciembre de 2015, y que además cumplieron los criterios de inclusión y exclusión que se describen a continuación.

4.2.1 Criterios de inclusión:

- Que el fármaco imTOR fuese iniciado después de los tres primeros meses post-trasplante.
- Previo al inicio del imTOR los pacientes debieron haber recibido tratamiento con un ICN durante un periodo mínimo de 3 meses.
- Firma del consentimiento informado.

4.2.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes a los que se les suspendió el imTOR durante los 3 primeros meses de tratamiento (suspensiones precoces).
- Pacientes a los que se les suspendió el tratamiento con imTOR debido a un episodio de rechazo agudo.

Un total de 637 receptores de trasplante renal iniciaron tratamiento con un imTOR en las 2 cohortes estudiadas; 414 (un 65%) pertenecían a la cohorte de Madrid y 223 (un 35%) a la de Santander. Fueron descartados 37 sujetos en los que se suspendió precozmente el imTOR. También se descartaron 17 pacientes en los que el motivo de suspensión del tratamiento fue un episodio de rechazo agudo. La muestra final sobre la que se realizó el estudio incluyó, por tanto, un total de 583 pacientes, 376 (un 64,5%) pertenecientes a la cohorte de Madrid, y 207 (un 35,5%) a la de Santander.

Se genotiparon los polimorfismos del gen del VEGF en un total de 419 pacientes; 334 pertenecientes a la cohorte de Madrid (perdidos un 11,2%), y 85 pertenecientes a la de Santander (perdidos un 58,9%).

4.3 Registro de los datos

Los datos, variables e información clínica de cada sujeto incluido en el estudio fueron recogidos en una base diseñada específicamente mediante el programa *Microsoft® Access®* versión 2013. Se recogieron los datos previos al año 2015 de forma retrospectiva, a partir de los registros individualizados que se encuentran disponibles en la consulta de trasplante renal. Desde el años 2015 los datos fueron recogidos de forma prospectiva.

A continuación se detallan las variables e información recogida en la base de *Access*.

4.3.1 Datos demográficos y clínicos generales:

Fecha de nacimiento, sexo, etiología de la enfermedad renal crónica (ERC) de base, fecha del trasplante renal, tipo de donante, edad del donante y número de veces que el paciente ha recibido un trasplante renal.

4.3.2 Datos de la conversión de ICN a imTOR:

- I-mTOR: tipo (sirolimus o everolimus), causa de la conversión y fecha de inicio; suspensión (sí/no), con fecha de suspensión y causa de la misma (si procede).
- ICN: tipo (ciclosporina o tacrolimus), suspensión del ICN (sí/no) y fecha de dicha suspensión (si procede).

4.3.3 Cronología de la recogida del resto de datos:

El resto de datos de interés, ya sean clínicos, analíticos o referentes al tratamiento del paciente trasplantado renal, fueron recogidos en una serie de fechas específicas para cada paciente, como se describe a continuación, relacionadas con el momento de inicio del imTOR:

- Datos previos a la introducción del imTOR: 1 año, 6 meses y 3 meses antes. Se recogieron los datos siempre que en el *momento a valorar* el paciente ya hubiese portado el injerto a estudio durante al menos 3 meses desde el trasplante.
- Datos basales: al momento del inicio del fármaco imTOR.
- Datos posteriores a la conversión (durante un periodo máximo de 5 años): a la semana, a los 15 días, a los 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 18 meses, y a los 2, 3, 4 y 5 años de inicio del tratamiento con imTOR.

4.3.4 Datos recogidos en cada revisión específica de consulta:

Datos clínicos y analíticos:

- Presión arterial sistólica y diastólica (expresada en mmHg).
- Peso (kg).
- Parámetros de función renal: creatinina en sangre y orina (mg/dL) y volumen de diuresis en 24 horas (mL).
- Proteinuria (mg/dL) cuantificada en orina minutada (recogida de diuresis de 24 horas).
- Hemograma: hemoglobina (g/dL), recuento plaquetario (por mL) y recuento leucocitario (por mL).
- Perfil de sideremia.

- Perfil lipídico incluyendo colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos (expresados todos en mg/dL).
- Glucemia (mg/dL) y hemoglobina glicada (HbA1c).

Datos relacionados con el tratamiento inmunosupresor:

- Niveles valle en sangre del ICN (ng/mL).
- Niveles valle en sangre del imTOR (ng/mL).
- Dosis diaria del ICN, expresada en mg/ día.
- Dosis diaria del imTOR, expresada en mg/ día.
- Dosis diaria del fármaco antimetabolito asociado al tratamiento (mg/ día).
- Dosis diaria de prednisona (mg/ día).

Datos referentes al resto de tratamientos:

- Número de fármacos antihipertensivos que toma el sujeto.
- Uso de Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) o de Antagonistas de los Receptores de la Angiotensina-II (ARA-II): Sí/No.
- Tratamiento para la diabetes mellitus (variable cualitativa multinomial): si el paciente estaba tratado con insulina, tratado con antidiabéticos orales exclusivamente, o si no estaba bajo tratamiento antidiabético.
- Toma de hipolipemiantes (cualitativa multinomial): si recibía estatinas, ezetimibe, ambos asociados, si recibía otros fármacos diferentes para la dislipemia, o si no tomaba tratamiento hipolipemiante.
- Dosis prescrita de estatina (expresada en mg/ día) en los casos que proceda.
- Agentes estimulantes de la eritropoyesis: tipo y dosis semanal.

4.3.5 Evolución:

Cuando finalizó el seguimiento se registró si se había producido alguno de los siguientes eventos:

- Episodio de rechazo (sí/no) y tipo de rechazo.
- Pérdida del injerto (sí/no), con fecha y causa de la misma (si procede).
- Muerte del paciente (sí/no), con fecha y causa de la misma (si procede).

4.4 Variables independientes

A partir de la base de datos descrita previamente, se analizaron las siguientes variables independientes para la realización de esta tesis doctoral.

4.4.1 Variables generales del paciente y del trasplante renal:

- Fechas de nacimiento, de la cirugía de trasplante renal y del inicio del imTOR; cálculo de la edad del receptor (expresada en años) a partir de estas variables.
- Sexo del paciente.
- Causa de la ERC de base:
 - o Glomerulonefritis.
 - o Nefritis Túbulo-Intersticial Crónica (NTIC).
 - o Nefroangioesclerosis (NAE).
 - o Enfermedad poliquística.
 - o Diabetes mellitus.
 - o Causa sistémica.
 - o Otras etiologías.
 - o Causa no filiada.

- Tipo de trasplante renal: donante cadáver en muerte encefálica, donante vivo o donante en asistolia.
- Edad del donante. Se creó la variable cualitativa dicotómica “donante añoso” (sí/no), considerando “añosos” a los donantes de más de 60 años de edad.
- Número de trasplante renal realizado: primero, segundo, etc. Se creó la variable cualitativa dicotómica “retrasplante” (sí/no), considerando como tal a los pacientes que han recibido al menos dos trasplantes renales diferentes.

4.4.2 Variables de la conversión:

- Tipo de fármaco inhibidor de la calcineurina empleado previo a la conversión a imTOR (al menos durante 3 meses): ciclosporina o tacrolimus.
- Suspensión del ICN (sí/no). Se creó la variable “combinación con ICN” (sí/no), definida como positiva si el paciente mantuvo de inicio el tratamiento con ICN cuando inició el imTOR.
- Tipo de imTOR empleado en la conversión: sirolimus o everolimus.
- Tiempo post-trasplante de conversión: tiempo que ha transcurrido desde la cirugía de trasplante renal hasta el inicio del fármaco imTOR, calculado a partir de las fechas de trasplante y de conversión; se crearon dos variables cuantitativas para expresarlo en meses y en años.
- Tipo de fármaco inmunosupresor antiproliferativo asociado al tratamiento (al momento de la conversión): azatioprina, micofenolato mofetil, micofenolato sódico o ninguno.
- Tratamiento con corticoides (sí/no): definía si los pacientes estaban tratados con corticoides al momento de la conversión o no.

- Causa principal de la conversión de ICN a imTOR, recogida a partir de la historia clínica:
 - Prevención de disfunción crónica del injerto (DCI).
 - DCI instaurada.
 - Toxicidad o intolerancia a los ICN.
 - Historia de enfermedad tumoral maligna.
 - Minimización del riesgo cardiovascular.
 - Patología viral (virus CMV y BK).
 - Otras causas.
- Causas secundarias de la conversión de ICN a imTOR, variable cualitativa multinomial considerando los mismos ítems que los descritos como “causas principales”.

4.4.3 Variables clínico-analíticas

- Función renal basal: se utilizó la fórmula CKD-EPI para estimar la tasa de filtración glomerular (TFGe) de cada paciente. Para el análisis estadístico se creó la variable “CKD-EPI basal” que dividió a los pacientes en 4 categorías similares a los cuartiles (TFGe <30, 30-45, 45-55 y ≥ 55 mL/min). Para el análisis multivariado se simplificó en otra variable de 3 categorías, que se aproximaba a los terciles de TFGe: <35, 35-50 y >50 mL/min.
- Proteinuria basal: se categorizó en una variable que se aproximaba notablemente a sus cuartiles: <150, 150-300, 300-500 y ≥ 500 mg/ día. Para el análisis multivariado, dados los resultados del univariado, se simplificó en otra variable que fusionó las dos primeras categorías: <300, 300-500 y ≥ 500 mg/ día.

- Uso de bloqueantes del sistema renina-angiotensina (SRA) en el momento basal (sí/no), considerando fármacos IECA y ARA-II.
- Uso de bloqueantes del SRA al año de tratamiento con imTOR (sí/no).
- Diabetes mellitus (sí/no): se definió al paciente como “diabético” si estaba en tratamiento con insulina y/o antidiabéticos orales.
- Hipercolesterolemia basal (sí/no): se definió “hipercolesterolemia” como una cifra de colesterol sérico basal mayor o igual a 200 mg/dL.
- Hipertrigliceridemia basal (sí/no): se definió “hipertrigliceridemia” como cifra basal de triglicéridos en suero mayor o igual a 150 mg/dL.
- Presencia de anticuerpos donante-específicos (ADEs) y fecha de la primera detección de los mismos. Se creó la variable “ADEs-post” (sí/no), positiva si los anticuerpos aparecieron después de la conversión a imTOR.

4.4.4 Polimorfismos del gen del VEGF:

Se recogieron los resultados de los siguientes polimorfismos estudiados del gen del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular:

- SNP -2578: homocigoto C/C, heterocigoto C/A, homocigoto mutado A/A; y las variables portador de alelo C (sí/no) y portador de alelo A (sí/no) de este polimorfismo.
- SNP -1154: homocigoto G/G, heterocigoto G/A, homocigoto mutado A/A; y las variables portador de alelo G (sí/no) y portador de alelo A (sí/no) de este polimorfismo.

- SNP +936: homocigoto C/C, heterocigoto C/T, homocigoto mutado T/T; y las variables portador de alelo C (sí/no) y portador de alelo T (sí/no) de este polimorfismo.

4.5 Variables dependientes

Fueron las siguientes: proteinuria, función renal, suspensión del imTOR, supervivencia del injerto y supervivencia del paciente.

4.5.1 Proteinuria

Se recogió el dato de concentración (mg/dL) en orina minutada de diuresis en 24 horas (especificando volumen total en mL) para calcular la excreción total diaria. Aunque se dispuso del dato de creatinina en orina minutada (mg/dL) que permitía calcular el cociente Proteína/Creatinina (Pro/Cro) en orina, la variable principal a estudio fue la **proteinuria en 24 horas (expresada en mg/ día) al año de tratamiento**.

4.5.2 Variable proteinuria al año (P800)

Se completó la recogida de datos de orina durante el primer año de seguimiento en 551 de los 583 pacientes incluidos en el estudio (el 94,5%).

El análisis de frecuencias de proteinuria mostró que el 25% de los pacientes presentaron una proteinuria superior a 800 mg/ día al año post-conversión (P₇₅), que definimos como P800. Este dato lo consideramos relevante desde el punto de vista clínico en relación a mala respuesta o efecto adverso en el contexto de tratamiento con imTOR, por lo que lo establecimos como punto de corte para el análisis, creando la variable dependiente P800 (sí/no).

4.5.3 Función renal

Se expresó como tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) mediante la fórmula CKD-EPI (mL/minuto).

4.5.4 Suspensión del imTOR:

Se recogió la siguiente información al momento de la finalización del seguimiento dentro del estudio de cada paciente trasplantado renal:

- Continúa en tratamiento con imTOR (sí/no).
- Fecha de la suspensión del fármaco imTOR, en caso de que no continúe con dicho tratamiento.
- Causa de la suspensión del imTOR (en caso de que no continúe con dicho tratamiento al finalizar el estudio): anemia, leucopenia, trombopenia, dislipemia, mala cicatrización, úlceras orales, erupción cutánea, proteinuria, rechazo agudo, deterioro de función renal, pérdida del injerto, neumonitis, infección grave, muerte, u “otras causas”.

4.5.5 Supervivencia del injerto:

Se definió “pérdida del injerto” como reinclusión en programa crónico de diálisis o trasplante por disfunción severa del injerto, censurando por muerte del paciente con injerto funcionante. Se recogió la información de la situación del injerto a fecha de fin de seguimiento del estudio: funcionante, no funcionante o pérdida de seguimiento. Además, en los casos en los que procedió se recogió la siguiente información:

- Causa de la pérdida del injerto.
- Fecha de la pérdida del injerto.
- Fecha de la pérdida de seguimiento de la función del injerto.

4.5.6 Supervivencia del paciente:

Definida como fallecimiento del paciente. Se realizó seguimiento de cada sujeto a estudio hasta que fue reincluido en programa crónico de diálisis (pérdida de injerto), falleció, se perdió el seguimiento o completó el estudio (fecha fin 1-enero-2019). Se recogió la siguiente información:

- Situación del paciente al finalizar el seguimiento: vivo, muerto o pérdida de seguimiento.
- Causa de la muerte del paciente, en los casos en los que proceda.
- Fecha de la muerte del paciente, en los casos en los que proceda.
- Fecha de la pérdida de seguimiento del paciente, en los casos en los que proceda.

4.6 Ámbito del estudio y medios disponibles

4.6.1 Ámbito del estudio

Los sujetos incluidos en el estudio pertenecen a dos cohortes diferentes de pacientes trasplantados renales cuyo seguimiento se lleva a cabo en los siguientes Servicios:

- Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos, Madrid.
- Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

4.6.2 Medios disponibles

Los dos Servicios de Nefrología previamente citados disponen del equipamiento e infraestructura, tanto de personal como asistencial, adecuados para el seguimiento clínico del paciente trasplantado renal. Los datos analíticos de cada revisión en consulta son

recogidos de forma rutinaria en unas gráficas, las cuales están disponibles en carpetas individualizadas por paciente, que son archivadas en el área de Consulta de Trasplante.

En las carpetas individualizadas también se recogen datos como la tensión arterial, el peso del paciente y las modificaciones de su tratamiento farmacológico.

Por otro lado, este proyecto se ha podido llevar a cabo gracias a la participación del Servicio de Análisis Clínicos y del Servicio de Inmunología. Ambos cuentan con la infraestructura y equipamiento adecuados para realizar las determinaciones analíticas necesarias para el estudio:

- Equipo de congelación y ultracongelación.
- Microcentrífuga.
- Medios para la extracción de ADN.
- Espectrofotómetro.
- PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real.
- Termociclador para PCR.
- Estudio de electroforesis vertical y horizontal.
- Secuenciador *ABI Prism®*: sistema de electroforesis y detección de fluorescencia controlado por microprocesador, que se utiliza para realizar secuenciación de ADN, genotipado y estudio de *single nucleotide polymorphism* (SNP) detectados por PCR.

4.7 Determinación de los polimorfismos genéticos

Se obtuvieron muestras de ADN de los sujetos incluidos en el estudio para realizar los genotipados del gen del *Vascular Endothelial Groth Factor* (VEGF). El ADN se aisló a partir de tubos de sangre periférica extraída, anticoagulados con EDTA. Se realizaron los siguientes procedimientos:

4.7.1 Extracción del ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de cada muestra de sangre periférica utilizando el kit *DNeasy® Blood and Tissue* (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit emplea una tecnología basada en membranas de sílice con capacidad para adsorber específicamente el ADN. Se genera una lisis celular mediante un tampón de lisis con proteinasa K, y los contaminantes celulares se eliminan por centrifugación (las membranas de sílice son empacadas en columnas de centrifugado). Tras 2 procesos de lavado, el ADN es eluido en un búfer de baja salinidad con sales caotrópicas que promueven la desnaturalización de proteínas y la extracción del mismo.

4.7.2 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN

Se analizó la cantidad y pureza del ADN extraído utilizando el espectrofotómetro NanoDrop.

4.7.3 Genotipado de los polimorfismos

Con las muestras de ADN se realizó el genotipado de los siguientes polimorfismos de un único nucleótido (en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) en las posiciones -2578 C>A, -1154 G>A y +936 C>T del gen del VEGF. La metodología de la obtención del genotipado fue la siguiente:

- Se realizó PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real empleando como termociclador el Smart Cycler de CEPHEID (Sunnyvale, California, USA). Este equipo utiliza una resistencia como fuente de energía necesaria para proporcionar luz de excitación para los fluoróforos. La señal emitida es detectada por un fluorómetro con el que se monitoriza la reacción de amplificación del ADN.
- Se utilizaron ensayos *Taqman*® MGB (*Minor Groove Binding*), de *Applied Biosystems*™. Están compuestos por una *MasterMix*, común a todos los ensayos, el cual incluye la enzima ADN polimerasa, nucleótidos, un tampón o buffer, solución de cloruro de magnesio y una amperasa, necesaria para la degradación de aplicones inespecíficos. Por otro lado, el ensayo incluye los *primers* y las sondas de alelo específicas para los SNP que se quieren determinar. Estas sondas están marcadas por un fluoróforo en su extremo 5', y poseen un *quencher* con actividad secuestradora de fluorescencia en el extremo 3'. El ADN es amplificado mediante PCR en tiempo real y la sonda se une de forma específica a su fragmento de ADN complementario. Posteriormente, la ADN polimerasa hidroliza la sonda hibridada por medio de su actividad exonucleasa 5'→3'; esto provoca la liberación del *quencher* y, en consecuencia, la emisión de fluorescencia (**Figura 2**).

Las secuencias de los *primers* (cebadores) directos e inversos y de las dos sondas de cada uno de los tres polimorfismos estudiados se detallan en la Tabla 4.

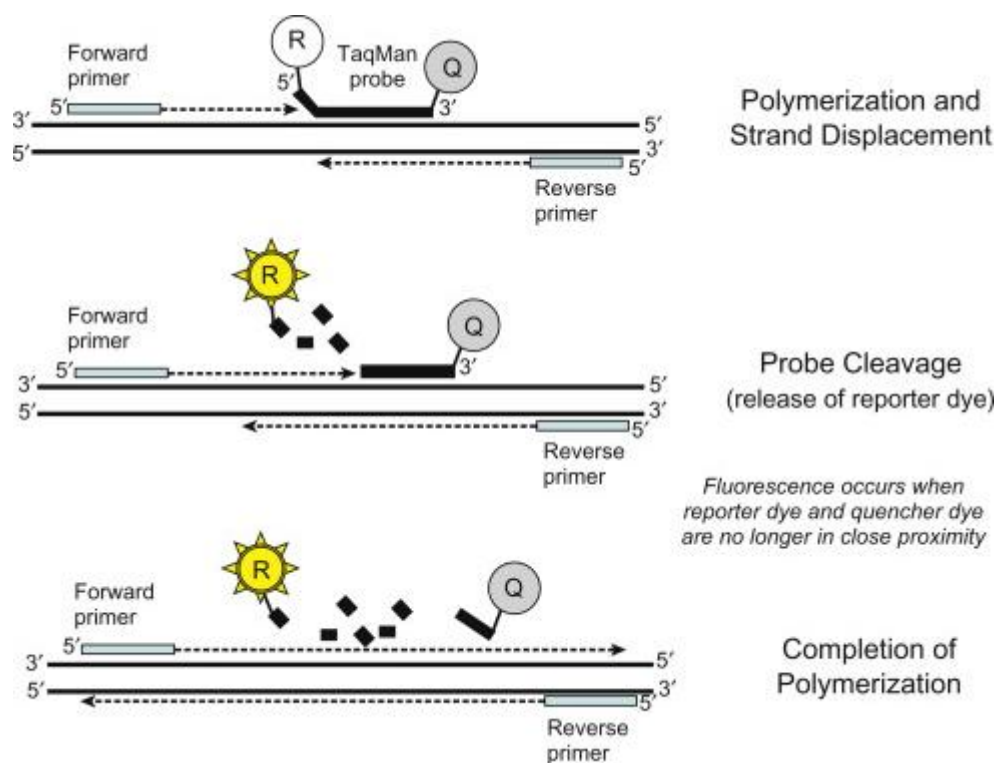


Figura 2. *Esquema del ensayo Taqman® (JM Butler²²⁷)*

Tabla 4. Secuencias de los *primers* directos e inversos y sondas de los SNP a estudio.

SNP	Secuencia	
-2578 C/A	<i>Primer</i> directo	5'-CAG AGG CTA TGC CAG CTG TA-3'
	<i>Primer</i> inverso	5'-GGT TTC TGA CCT GGC TAT TTC CA-3'
	Sonda WT C	5'-FAM-ACC CAG ATC GTG CCA G-MGB-NFQ-3'
	Sonda Var A	5'-TET-CAC CCA GAT CTT GCC AG-MGB-NFQ-3'
-1154 G/A	<i>Primer</i> directo	5'-CGG GCC AGG CTT CAC T-3'
	<i>Primer</i> inverso	5'-CCG CTA CCA GCC GAC TTT TAA-3'
	Sonda WT G	5'-FAM-CTC AGC CCC TCC ACA C-MGB-NFQ-3'
	Sonda Var A	5'-TET-CCT CAG CCC TTC CAC AC-MGB-NFQ-3'
+936 C/T	<i>Primer</i> directo	5'-ACT CCG GCG GAA GCA TTC-3'
	<i>Primer</i> inverso	5'-AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA-3'
	Sonda WT C	5'-FAM-CAA GAG GGA CCG TGC TG-MGB-NFQ-3'
	Sonda Var T	5'-TET-AAG AGG GAC CAT GCT G-MGB-NFQ-3'

WT: *wild type* (tipo silvestre, alelo “normal”); Var: variante (alelo mutado).

4.7.4 Elección de los SNP estudiados

Se estudiaron los SNP situados en las siguientes posiciones del gen del VEGF, numeradas desde el sitio de traducción: -1154G > A, -2578C > A y +936C > T.

Los dos primeros polimorfismos (-1154G > A y -2578C > A) se encuentran en la región promotora del gen del VEGF, mientras que el SNP +936C > T se sitúa en la región 3' no traducida.

Todos ellos están relacionados con variaciones en la síntesis proteica del VEGF. Los genotipos -1154 G/G y -2578 C/A parecen correlacionarse con una mayor expresión del VEGF, mientras que los portadores del alelo +936T se asocian a una expresión disminuida del mismo. Algunos estudios han relacionado las variaciones de estos SNP con resultados del trasplante renal en cuanto a incidencia de episodios de rechazo agudo, evolución de la función renal o supervivencia del injerto.

4.8 Determinación de los anticuerpos donante-específicos

Los anticuerpos donante-específicos (ADEs) son anticuerpos (Ac) formados contra antígenos HLA de clase I y II del donante. Su detección implica que el paciente ha presentado o tiene riesgo de presentar un rechazo agudo humoral.

A partir del año 2015 se implementó la determinación sistemática de ADEs de forma anual en todos nuestros pacientes. También se extrajeron muestras para su detección en los casos de sospecha de rechazo o de realización de biopsia renal por indicación clínica.

Para la determinación de los Ac anti-HLA se realizó primero screening utilizando el sistema Luminex 100 IS 2.3. Se consideró positivo una esfera con una intensidad de

fluorescencia media superior a 3.000; dicho punto de corte fue establecido en base a la experiencia de nuestro Centro. En caso de resultado positivo se implementó un estudio de especificidades utilizando *Single Antigen* (Tepnel Lifecodes LSATM Stamford CT, Diagnostica Longwood).

4.9 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se han expresado generalmente como media y su desviación estándar (DE), aunque en el caso de asimetría en la variable se han expresado como mediana y rango intercuartílico (RIC P₂₅-P₇₅).

Las variables cuantitativas dependientes fueron analizadas frente a cada variable independiente binomial (o multinomial) mediante el test de la *t* de Student. En caso de asimetría en la muestra se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Las variables cualitativas se han presentado según su distribución de frecuencias. Se estudió la asociación entre variables cualitativas mediante el test de Chi cuadrado. Excepcionalmente, si el porcentaje de casos esperados por debajo de 5 fue superior al 25% se utilizó la prueba exacta de Fisher. En cuanto a las variables ordinales, fueron evaluadas según la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones.

Se realizó un análisis de regresión logística uni y multivariado para identificar qué factores son predictores de desarrollo de P800. Se calculó la Odds ratio (OR) de cada variable con su intervalo de confianza (IC) al 95%. Se analizaron parámetros clínicos (variables demográficas, relativas al tratamiento inmunosupresor y a la medicación concomitante) y de laboratorio (TFGe, proteinuria, hipercolesterolemia e

hipertrigliceridemia basales) comparando los dos grupos de pacientes (P800 sí vs. no). En las variables cuantitativas se testó la asunción de linealidad. Posteriormente, se evaluaron las interacciones entre variables independientes mediante un análisis estratificado.

Se ajustó un modelo de regresión logística sobre la variable resultado principal (P800) incluyendo aquellas variables que obtuvieron en el análisis univariado un valor de la *p* del contraste inferior a 0,1, o bien se tratara de variables relevantes desde el punto de vista clínico. El modelo permitió explicar la relación entre las variables pronósticas y la probabilidad de desarrollar el evento a estudio. Para estimar la magnitud del riesgo de cada una de ellas se calculó su *odds ratio* (OR) o razón de ventajas, con su intervalo de confianza al 95%. Se calculó la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para valorar la predicción del modelo ajustado. Se presentó el área bajo la curva con su IC al 95%, así como la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Se estimaron las tasas de supervivencia del injerto y del paciente mediante el método de Kaplan-Meier. Se calcularon las funciones de supervivencia mediante tablas de vida estudiando la pérdida del injerto y la supervivencia del paciente trasplantado renal en función de la variable P800. Se presentaron las gráficas de las curvas de supervivencia estimadas. Para comparar las funciones de supervivencia de ambos grupos se utilizó el test exacto de Breslow; esta prueba estadística compara el número de eventos observados de cada subgrupo frente al número de eventos esperados si se cumple la condición de que la variable dependiente tenga la misma distribución en todas las categorías (hipótesis nula); en caso contrario se utilizó log-rank test.

Se realizó análisis de regresión de Cox simple para valorar la magnitud del efecto de la proteinuria (o de determinados SNP o alelos del gen del VEGF) sobre la supervivencia del injerto renal y del paciente. Los resultados se presentaron como *hazard ratio* (HR) o razón de tasas de incidencias, ajustadas con su intervalo de confianza al 95%. Cuando el coeficiente β fue positivo indicó un aumento de la HR y por tanto un peor pronóstico del sujeto a mayor valor de la variable X. Un coeficiente β de signo negativo indicó lo contrario. El exponencial del coeficiente β , $\text{Exp}(\beta_i)$, se interpreta como la HR cuando la variable X se incrementa en una unidad. En caso de las variables dicotómicas este incremento implica pasar de no tener (0) a presentar (1) esa característica o factor X.

En todos los contrastes de hipótesis analizados se rechazó la hipótesis nula con un error α o tipo I inferior a 0,05.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete informático IBM® SPSS® statistics 20.

4.10 Limitaciones del estudio

4.10.1 Validez interna

Sesgo de selección: se incluyeron de forma consecutiva todas las introducciones de imTOR realizadas (siempre que cumpliesen los criterios de inclusión) pero no se pudieron determinar los polimorfismos del gen del VEGF en todos ellos.

4.10.2 Validez externa

Una de las debilidades de este trabajo ha sido no contar con un grupo control de sujetos, en los que no se hubiese realizado conversión a imTOR, para poder realizar

comparaciones en cuanto a desarrollo de proteinuria y supervivencia del injerto renal y del enfermo entre ambos brazos.

4.11 Consideraciones éticas

El presente estudio de investigación se ha llevado a cabo de acuerdo a los principios éticos derivados de la Declaración de Helsinki (Tokio, 2004) y de acuerdo a la normativa legal vigente, siguiendo las directrices de la “Buena Práctica Clínica”.

Para la determinación de los polimorfismos genéticos a estudio, que fueron la base de este proyecto de investigación, se obtuvo previamente la aprobación del Comité de Ética.

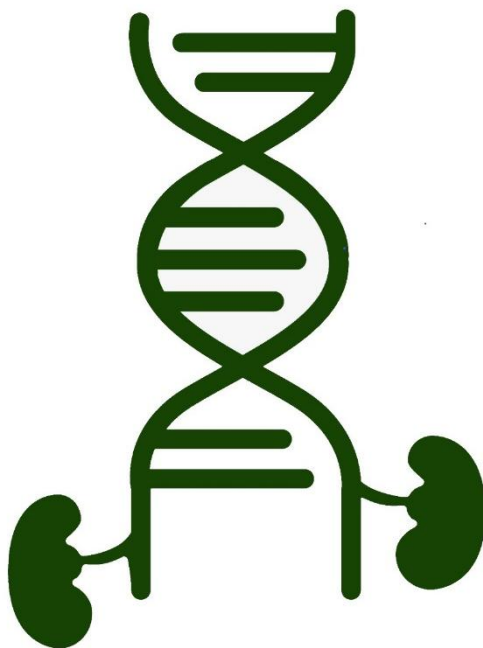
Se informó a cada sujeto al que se le solicitó la participación en el estudio de los objetivos, métodos, ventajas y riesgos del mismo; también se les explicó que eran libres tanto de rechazar su participación en el estudio como de revocar el consentimiento posteriormente por cualquier causa y sin perjuicio alguno. Una vez aceptada su participación firmaron el documento de Consentimiento Informado.

Los datos demográficos, clínicos y analíticos de los sujetos incluidos en el estudio han sido recopilados de forma confidencial y anónima, y están protegidos conforme a la legislación española vigente.

En base a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD 15/1999) los pacientes tienen derecho a acceder, rectificar, cancelar o revocar el permiso de utilización de los mismos (derechos A.R.C.O.).

Ninguno de los investigadores presenta conflictos de interés con el estudio realizado.

5. RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Población a estudio

Entre los años 1999 y 2015, un total de 637 pacientes trasplantados renales de las poblaciones dependientes del Hospital Clínico San Carlos (Madrid) y del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) iniciaron tratamiento con un inhibidor mTOR (imTOR) a partir del tercer mes post-trasplante.

Gran parte de las conversiones a imTOR (384, un 60,3%) fueron realizadas en el periodo que abarca entre los años 2006 y 2011 (**Figura 3**).

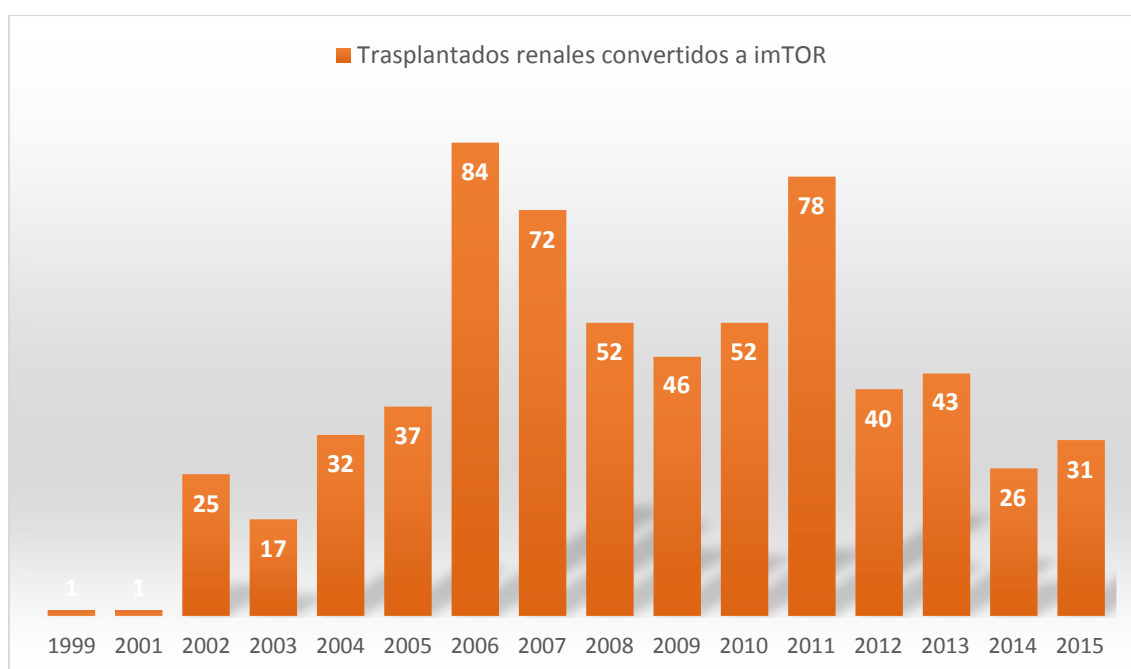


Figura 3. *Número de conversiones a imTOR por año.*

De esos 637 sujetos se descartaron para el estudio 17 casos en los que el fármaco imTOR fue suspendido posteriormente debido a un episodio de rechazo agudo. Otros 37 enfermos trasplantados renales fueron excluidos también debido a que no completaron un periodo mínimo de al menos 3 meses de tratamiento con el imTOR. La población a estudio tiene, por tanto, una N de 583 pacientes.

5.2 Análisis descriptivo de la población a estudio

De los 583 trasplantados renales estudiados 394 eran varones (67,6%) y 189 mujeres (32,4%). En 495 de los casos (84,9%) el sujeto había sido sometido a cirugía de trasplante renal por primera vez, mientras que los 88 restantes (un 15,1%) fueron re-trasplantes.

La edad media de los pacientes al iniciar el tratamiento imTOR fue de $55,7 \pm 13,4$ años.

Los pacientes tenían un tasa de filtración glomerular (TFG) media, estimada por la fórmula CKD-EPI, de $46,0 \pm 18,3$ ml/min en el momento basal (momento previo al inicio del imTOR).

La mediana de proteinuria basal fue de 291,5 mg/ 24h (rango intercuartílico [RIQ] 151-521).

La conversión o inicio del imTOR se realizó en una mediana de tiempo post-trasplante de 50,8 meses (RIQ, 13,8-121,9 meses).

La mediana de seguimiento de los sujetos a estudio fue de 76,5 meses (RIQ, 45,1-111,0).

Durante dicho seguimiento se suspendió el tratamiento con imTOR en 205 casos (35,2% del total), en una mediana de tiempo de 19,8 meses (RIQ, 7,8-45,1) desde el inicio del fármaco. Se realizó un seguimiento de pacientes trasplantados **bajo tratamiento con**

imTOR (es decir, hasta que fue suspendido, se perdió el injerto renal o el sujeto, o bien finalizó el estudio) durante una mediana de tiempo de 51,2 meses (RIQ 17,1-92,1).

5.2.1 Etiología de la enfermedad renal

En relación a la etiología de la enfermedad renal crónica (ERC) de base (Tabla 5), destacaron 191 casos debidos a glomerulonefritis (32,8%), seguidos de 92 casos de enfermedad poliquística (15,8%), 90 de nefritis túbulo-intersticiales (15,4%) y 44 de etiología diabética (7,5%).

Tabla 5. Etiología de la enfermedad renal de base.

Tipo de Enfermedad Renal basal	N	Porcentaje (%)
Glomerulonefritis	191	32,8
Poliquistosis renal	92	15,8
Nefropatías túbulo-intersticiales	90	15,4
Diabetes Mellitus	44	7,5
Nefroangioesclerosis	35	6
Enfermedades sistémicas	9	1,5
No filiadas	37	6,3
Otras	85	14,6

5.2.2 Tratamiento inmunosupresor de la población a estudio

La gran mayoría de los sujetos a estudio estaban recibiendo un régimen inmunosupresor basado en un inhibidor de la calcineurina (ICN) previo a comenzar el tratamiento con imTOR. Un total de 403 pacientes recibían tacrolimus (69,1%), mientras que 170 (29,2%) estaban en tratamiento con ciclosporina (CsA). Únicamente 10 de los pacientes incluidos (un 1,7%) no estaban recibiendo ningún tipo de ICN al momento de iniciar el imTOR (aunque sí lo habían recibido previamente, durante un periodo de al menos tres meses).

Conversión vs. Terapia combinada: En 85 de los sujetos a estudio se mantuvo el tratamiento con ICN (14,6%) por lo que se optó por una terapia combinada (ICN + imTOR). En estos casos el inicio del imTOR permitió minimizar la exposición crónica al ICN, ajustando sus dosis a niveles objetivo sensiblemente menores. De los 498 restantes que sí suspendieron el ICN (un 85,4%), excluyendo los 10 pacientes mencionados que no lo recibían, obtuvimos un total de 488 casos, un 83,7%, de conversiones puras de un régimen de ICN a otro de imTOR.

En cuanto al fármaco imTOR iniciado, 296 casos (50,8%) fueron tratados con sirolimus (SRL) y 287 (49,2%) con everolimus (EVL).

El tipo de tratamiento antiproliferativo asociado al esquema inmunosupresor consistía en micofenolato mofetil en 210 sujetos (36%), micofenolato sódico en 199 (34,1%) y azatioprina en 37 de los mismos (6,3%). Un total de 137 de los pacientes estudiados (un 23,5%) no recibían ningún inmunosupresor de tipo antimetabolito al momento de la conversión.

En relación al tratamiento corticoesteroideo, 347 pacientes (59,5%) estaban recibiendo prednisona al momento de iniciar el imTOR, mientras que 236 (40,5%) ya habían suspendido el tratamiento con corticoides previamente.

5.2.3 Indicación de conversión o inicio de imTOR

Diversas causas dieron lugar a que el nefrólogo responsable indicase el tratamiento inmunosupresor con imTOR (Tabla 6). En la mayoría de los casos (85,4%) quedó suspendido por completo el ICN, mientras que en 85 pacientes (14,6%) se optó por un protocolo mixto de imTOR e ICN.

Tabla 6. Factores causales de conversión/inicio de im-TOR.

Factor causal de inicio de imTOR	Como causa primaria	Como causa secundaria	Total N y porcentaje(%)	Como causa más grave
Preventivo DCI	43 (7,4%)	2 (0,3%)	45 (7,7%)	42 (7,2%)
FI-AT	131 (22,5%)	14 (2,4%)	145 (24,9%)	123 (21,1%)
Toxicidad por ICN	29 (5%)	1 (0,2%)	30 (5,2%)	28 (4,8%)
Diagnóstico oncológico	237 (40,7%)	8 (1,4%)	245 (42,1%)	244 (41,9%)
Patología vascular	34 (5,8%)	8 (1,4%)	42 (7,2%)	38 (6,5%)
Enfermedad viral	77 (13,2%)	5 (0,9%)	82 (14,1%)	76 (13%)
Otras causas	32 (5,5%)	15 (2,6%)	47 (8,1%)	32 (5,5%)
TOTAL	583 (100%)	53 (9,1%)	-	583 (100%)

En algunos casos concurrieron dos o más factores o circunstancias clínicas que justificaron la indicación del imTOR; en estos casos se clasificó cada causa como primaria o secundaria. La causa primaria o principal más frecuente fue la historia previa o diagnóstico de enfermedad tumoral: un total de 237 pacientes (40,7%). Por orden de frecuencia le siguen las siguientes causas: fibrosis intersticial y atrofia tubular de origen inespecífico [FIAT-i] (131 casos, 22,5%); patología viral (77 casos, 13,2%); conversión preventiva de disfunción crónica del injerto (DCI) renal (43 casos, 7,4%); historia de patología vascular (34 casos, 5,8%); y toxicidad por ICN (29 casos, 5%).

La “patología viral” como causa de indicación de imTOR incluyó lo siguiente:

- Viremia, viruria significativa y/o diagnóstico de nefropatía por virus BK.
- Pacientes con alto riesgo de infección por citomegalovirus (CMV), infección recidivante o enfermedad por CMV.

Un total de 53 pacientes (9,1%) presentaron al menos 2 factores que motivaron al nefrólogo a realizar la conversión o el inicio de un imTOR. Como factores secundarios añadidos a la causa primaria destacaron los siguientes: FIAT-i (14 casos, 2,4%), historia o diagnóstico oncológico (8 casos, 1,4%), patología vascular (también 8 casos, 1,4%), y patología viral (5 casos, 0,9%), considerándose tanto la infección por virus BK o por CMV como el alto riesgo de desarrollar alguna de ellas. Si escogemos en cada caso el factor causal más relevante en cuanto a repercusión sobre la mortalidad del sujeto (“factor más grave”) de entre todas las causas primarias y secundarias, encontramos que disminuye ligeramente el porcentaje correspondiente al daño histológico renal (FI-AT) como factor causante: del 24,8% (sumando cuando es causa principal y secundaria) al 21,1%; y aumenta ligeramente el de patología cardiovascular como motivo de inicio de

imTOR: de un 5,8% a un 6,5%. El resto de datos, por lo demás, se mantienen muy similares (Tabla 6).

5.2.4 Historia oncológica como causa de conversión

Globalmente, el factor precipitante más frecuente de la utilización de los imTOR fue el diagnóstico previo o incidental de una enfermedad tumoral maligna. La historia de patología oncológica estuvo presente en un total de 245 casos (42,1%), los cuales pueden dividirse en 119 pacientes (20,4%) en los que se trató de un tumor sólido, 90 (15,4%) que presentaron o habían presentado un cáncer de piel no melanocítico; 23 (3,9%) que desarrollaron una enfermedad linfo-proliferativa post-trasplante; 9 (1,5%) que sufrieron un sarcoma de Kaposi; y 4 pacientes (0,7%) afectados por un melanoma (Tabla 7).

Tabla 7. Patología oncológica como indicación de im-TOR.

Tipo de neoplasia maligna	N	Porcentaje (%)
Tumor sólido	119	20,4
Trastorno linfo-proliferativo	23	3,9
Cutáneo no melanocítico	90	15,4
Melanoma	4	0,7
Sarcoma de Kaposi	9	1,5
TOTAL	245	42

5.2.5 Otras causas de conversión o inicio de imTOR

Los casos de toxicidad por ICN como factor primario comprendieron, por un lado, 23 pacientes (3,9%) con efectos secundarios a nivel del sistema nervioso central, y por otro 6 pacientes (1%) con toxicidad renal documentada histológicamente.

En cuanto a la patología viral, el poliomavirus fue el responsable en 58 casos del inicio del imTOR (9,9%), mientras que el CMV lo fue en 18 casos (3,1%). Además, 1 paciente fue afecto de infección por ambos virus, y otros 5 (0,9%) presentaron complicaciones del trasplante relacionadas con otros tipos de infecciones virales que también constituyeron causa de inicio de imTOR.

La patología vascular fue causante de conversión o inicio de imTOR cuando, por su relevancia clínica, se consideró beneficioso suprimir (o minimizar) el efecto de los ICN; lo fue en un total de 42 casos (7,2%): en 34 ocasiones como factor principal, y en 8 como factor secundario.

5.3 Incidencia de los polimorfismos del gen del VEGF

Se realizó el genotipado de los siguientes polimorfismos del gen del VEGF:

- SNP -1154G > A en 416 casos (71,4% de la población a estudio).
- SNP -2578C > A en 419 casos (71,9% de la población a estudio).
- SNP +936C > T en 418 casos (71,7% de la población a estudio).

5.3.1 VEGF -1154 G>A

Se obtuvieron los siguientes resultados de frecuencias en nuestra población:

- 210 pacientes homocigotos G/G (50,5%).

- 162 pacientes heterocigotos G/A (38,9%).
- 44 pacientes homocigotos mutados A/A (10,6%).

5.3.2 VEGF -2578 C>A

De este SNP se obtuvo la siguiente distribución de frecuencias:

- 210 pacientes heterocigotos A/C (50,1%).
- 121 pacientes homocigotos C/C (28,9%).
- 88 pacientes homocigotos mutados A/A (21%).

5.3.3 VEGF +936 C>T

En relación a este SNP obtuvimos los siguientes resultados en nuestra población:

- Una mayoría de 316 pacientes homocigotos C/C (75,6%).
- 91 pacientes heterocigotos C/T (21,8%).
- 11 pacientes homocigotos mutados T/T (2,6%).

Se compararon las frecuencias de los genotipos de cada SNP en las dos cohortes a estudio (Madrid y Santander), descritas en la Tabla 8. Ambas poblaciones presentaron porcentajes muy similares y no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al contrastar las frecuencias de los polimorfismos estudiados.

Tabla 8. Incidencia de los SNP en las dos cohortes a estudio.

SNP del VEGF	Cohorte Madrid	Cohorte Santander
-1154 G>A p=0,63	GG 169 (50,6%)	GG 41 (50%)
	GA 132 (39,5%)	GA 30 (36,6%)
	AA 33 (9,9%)	AA 11 (13,4%)
-2578 C>A p=0,48	CC 92 (27,5%)	CC 29 (34,1%)
	CA 170 (50,9%)	CA 40 (47,1%)
	AA 72 (21,6%)	AA 16 (18,8%)
+936 C>T p=0,97	250 (75,3%)	65 (76,5%)
	73 (22%)	18 (21,2%)
	9 (2,7%)	2 (2,4%)

5.3.4 Desequilibrio de ligamiento

Se evaluó si los SNP estudiados presentaron desequilibrio de ligamiento, relacionado con la propiedad de algunos genes de no segregar de forma independiente, y que se comporta como una asociación estadística entre dos SNP. Encontramos desequilibrio de ligamiento entre los SNP -2578 C>A y -1154 G>A ($p<0,001$):

- El 98,3% de los sujetos -2578 C/C presentaron -1154 G/G (en ambos casos genotipos *wild type*).

- El 73,5% de los sujetos -1154 G/A fueron también heterocigotos -2578 A/C.
- El 77,3% de los sujetos -1154 A/A fueron también homocigotos -2578 A/A.

El alelo -2578C se ligó a la presencia del alelo -1154G: los pacientes con alelo -2578C fueron en el 97% de los casos portadores de -1154G ($p<0,001$).

Sólo un 13,8% de los portadores del alelo -2578C presentaron el alelo -1154A ($p<0,001$).

También encontramos **ligamiento entre los alelos -2578A y -1154A:** el 98,3% de los portadores de -2578A portaban -1154A y el 99% de éstos últimos portaban -2578A ($p<0,001$).

No encontramos ninguna asociación estadística, en cambio, entre los genotipos del SNP +936 y el resto de polimorfismos estudiados.

5.4 Evolución de la proteinuria y la función renal

5.4.1 Valores basales y previos al imTOR de función renal y proteinuria

No encontramos diferencias significativas en la TFG estimada (TFGe) por CKD-EPI cuando comparamos función renal basal con los datos previos:

- TFG 1 año antes del inicio del imTOR: $46,7 \pm 17,4$ mL/min vs. $47,0 \pm 18,3$ mL/min basal, p 0,72 (N=424).
- TFG 6 meses antes del inicio del imTOR: $46,2 \pm 17,8$ mL/min vs. $46,5 \pm 18,3$ mL/min basal, p 0,55 (N=444).

- TFG 3 meses antes del inicio del imTOR: $45,6 \pm 18,0$ mL/min vs. $45,9 \pm 18,5$ mL/min basal, $p=0,45$ (N=500).

Del mismo modo, cuando comparamos la mediana (RIQ) de proteinuria (Pro) basal con los datos pre-imTOR, mediante el test de Wilcoxon, no encontramos diferencias estadísticamente significativas:

- Pro 1 año antes del inicio del imTOR: (N=405) 242 (111,5-500) vs. Basal 291,5 (151-521) mg/ 24h, $p=0,28$.
- Pro 6 meses antes del inicio del imTOR: (N=428) 248,5 (126,7-483) vs. Basal 291,5 (151-521) mg/ 24h, $p=0,34$.
- Pro 3 meses antes del inicio del imTOR: (N=494) 274 (140-541,5) vs. Basal 291,5 (151-521) mg/ 24h, $p=0,10$.

5.4.2 Función renal y proteinuria al año de tratamiento

Los pacientes presentaron, como se ha mencionado previamente, una función renal media (TFGe por CKD-EPI) de $46,0 \pm 18,3$ ml/min en el momento basal. Tras un año de tratamiento con imTOR se obtuvo una TFG media de $47,3 \pm 19,5$ ml/min (N de 526), $p=0,049$.

Por otro lado, presentaban una mediana de proteinuria basal de 291,5 mg/ 24h (RIQ 151-521). Al año, la mediana de proteinuria que se obtuvo aumentó hasta 411,3 mg/ 24h (RIQ, 237-801,5), sobre una N total de 526 sujetos (57 perdidos), siendo esta diferencia significativa: $p<0,001$ (test de Wilcoxon).

5.4.3 Proteinuria superior a 800 mg/ día (P800)

Un año después de la introducción del imTOR, 551 pacientes (un 94,5% de la muestra inicial) continuaban en seguimiento y completaron la recogida de datos de orina.

El análisis de frecuencias mostró que el 25% de los pacientes presentaron una proteinuria superior a 800 mg/día al año de tratamiento imTOR (P_{75}), que definimos como P800. Este valor lo consideramos clínicamente relevante de acuerdo a la repercusión que tiene la proteinuria sobre el riñón trasplantado descrita en la literatura, por lo que el análisis estadístico fue realizado en función de si los pacientes desarrollaron o no P800.

5.4.4 Evolución de la función renal según los SNP del VEGF

Estudiamos la función renal (TFG estimada por CKD-EPI) basal y al año post-imTOR en función de los genotipos de cada SNP a estudio. No encontramos diferencias significativas en relación a ninguno de ellos. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

SNP -1154 G>A:

Función renal basal ($p=0,38$):

- GG $46,5 \pm 17,7$ mL/min.
- GA $46,6 \pm 17,9$ mL/min.
- AA $42,7 \pm 16,1$ mL/min.

Función renal al año ($p=0,89$):

- GG $47,7 \pm 20,2$ mL/min.
- GA $48,3 \pm 19,5$ mL/min.
- AA $46,8 \pm 16,2$ mL/min.

SNP -2578 C>A:

Función renal basal (p=0,63):

- CC 47,4±17,4 mL/min.
- AC 46,0±17,6 mL/min.
- AA 45,1±17,7 mL/min.

Función renal al año (p=0,83):

- CC 48,8±20,4 mL/min.
- AC 47,5±18,9 mL/min.
- AA 47,8±19,8 mL/min.

SNP +936 C>T:

Función renal basal (p=0,81):

- CC 46,6±17,3 mL/min.
- CT 45,2±18,9 mL/min.
- TT 46,6±14,1 mL/min.

Función renal al año (p=0,44):

- CC 48,7±19,6 mL/min.
- CT 46,4±19,5 mL/min.
- TT 43,4±14,6 mL/min.

5.5 Análisis univariado para proteinuria (P800)

Los resultados del análisis de regresión logística univariado para el evento P800 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis univariable para proteinuria (P800).

Variables analizadas	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
Sexo			
- Varón	109/374 (29,3%)	1,28 (0,85 – 1,93)	0,24
- Mujer	43/177 (24,3%)	1	
Edad al iniciar imTOR			0,09
- ≤ 45 años	40/129 (31,0%)	1,25 (0,74 – 2,10)	0,41
- 45 – 55 años	41/122 (33,6%)	1,40 (0,83 – 2,37)	0,21
- 55 – 65 años	32/153 (20,9%)	0,73 (0,43 – 1,25)	0,25
- > 65 años	39/147 (26,5%)	1	
Causa de ERC			0,92
- Vascular/NAE	8/32 (25,0%)	0,86 (0,38 – 1,97)	0,72
- Diabetes	11/42 (26,2%)	0,92 (0,45 – 1,88)	0,81
- Otras	133/477 (27,9%)	1	
Edad del donante			
- < 60 años	133/480 (27,7%)	1	
- ≥ 60 años	19/71 (26,8%)	0,95 (0,54 – 1,67)	0,87
Nº de trasplante			
- 1º trasplante	129/472 (27,3%)	1	
- Retrasplante	23/79 (29,1%)	1,09 (0,65 - 1,85)	0,74
Tiempo postrasplante de conversión			
- < 36 meses	50/230 (21,7%)	1	
- ≥ 36 meses	102/321 (31,8%)	1,68 (1,13 – 2,48)	0,01
TFG basal			<0,001
- > 50 mL/min	27/209 (12,9%)	1	
- 35-50 mL/min	51/170 (30,0%)	2,89 (1,72 – 4,86)	<0,001
- < 35 mL/min	74/172 (43,0%)	5,09 (3,07 – 8,43)	<0,001
Proteinuria basal			<0,001
- < 300 mg/día	31/285 (10,9%)	1	
- 300-500 mg/día	39/118 (33,1%)	4,05 (2,37 – 6,91)	<0,001
- > 500 mg/día	80/144 (55,6%)	10,24 (6,23 – 16,84)	<0,001

Variables analizadas	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
Colesterolemia			
- < 200 mg/dL	96/421 (22,8%)	1	
- ≥ 200 mg/dL	56/129 (43,4%)	2,60 (1,71 – 3,94)	<0,001
Trigliceridemia			
- < 150 mg/dL	90/382 (23,6%)	1	
- ≥ 150 mg/dL	62/167 (37,1%)	1,92 (1,29 – 2,84)	0,001
Tipo de imTOR			
- Sirolimus	78/273 (28,6%)	1	
- Everolimus	74/278 (26,6%)	0,91 (0,63 – 1,33)	0,61
Combinación con ICN			
- No	131/468 (28,0%)	1	
- Sí	21/83 (25,3%)	0,87 (0,51 – 1,49)	0,61
MMF/AMF basal			
- No	47/156 (30,1%)	1	
- Sí	105/395 (26,6%)	0,84 (0,56 – 1,26)	0,40
Corticoides			
- No	50/226 (22,1%)	1	
- Sí	102/325 (31,4%)	1,61 (1,09 – 2,38)	0,017
Diabetes			
- No	141/509 (27,7%)	1	
- Sí	11/42 (26,2%)	0,93 (0,45 – 1,89)	0,83
Bloqueo SRA basal			
- No	54/247 (21,9%)	1	
- Sí	98/304 (32,2%)	1,70 (1,16 – 2,50)	0,007
Bloqueo SRA al año			
- No	29/187 (15,5%)	1	
- Sí	98/327 (30,0%)	2,33 (1,47 – 3,70)	<0,001
ADEs post-imTOR			
- No	100/400 (25%)	1	
- Sí	13/42 (31%)	1,35 (0,67 – 2,69)	0,40

5.5.1 Tipo de imTOR

Según el tipo de fármaco imTOR utilizado, encontramos que 78 de los 273 pacientes trasplantados tratados con SRL (28,6%), y 74 de los 278 que recibieron EVL (26,6%) desarrollaron P800, sin observarse diferencias significativas entre ambos (p=0,6).

5.5.2 Función renal basal

En cuanto a la función renal de base, sí encontramos diferencias significativas ($p<0,001$) de aparición de P800 al estratificar por TFGe (Tabla 9); los pacientes que partían de un filtrado glomerular inferior a 35 mL/min tuvieron 5 veces más riesgo de proteinuria que los que presentaban >50 mL/min basalmente. Dividiendo por cuartiles (Tabla 10), desarrollaron P800 sólo el 12,7% de los pacientes con TFG basal superior a 55 mL/min, el 21,8% de los que presentaban un filtrado de 45-55 mL/min; el 34,7% de los que partían de 30-45 mL/min, y hasta el 43% de los sujetos con una TFG basal inferior a 30 mL/min. Por tanto, cuanto peor es la función renal basal, mayor es el porcentaje encontrado de pacientes proteinúricos ($p<0,001$).

Tabla 10. Desarrollo de proteinuria según función renal basal.

TFGe basal	Pro $<0,8$ g/d	P800	OR	p	Total
<30 mL/min	65 (57%)	49 (43%)	5,2 (2,8-9,4)	$<0,001$	114
30-44 mL/min	111 (65,3%)	59 (34,7%)	3,6 (2,1-6,4)	$<0,001$	170
45-54 mL/min	86 (78,2%)	24 (21,8%)	1,9 (1,0-3,7)	0,005	110
≥ 55 mL/min	137 (87,3%)	20 (12,7%)	1	-	157
Total	399 (72,4%)	152 (27,6%)	-	$<0,001$	551

5.5.3 Tiempo post-trasplante de conversión

El momento o tiempo post-trasplante en el que se realizó la conversión de ICN a imTOR (o bien el inicio de imTOR para combinar ambos) también tuvo influencia en el desarrollo

de proteinuria. Sobre una N de 551 casos (32 perdidos) se realizaron 230 (41,7%) introducciones de imTOR durante los 36 primeros meses del trasplante renal, frente a 321 (58,3%) que fueron realizadas posteriores al 36º mes. Al año de tratamiento, se objetivó P800 en el 21,7% (50 casos) de las conversiones previas al 36º mes, frente al 31,8% (102 casos) que alcanzó el grupo de conversiones más tardías, que tuvo un riesgo de proteinuria mayor (**Figura 4**): OR 1,68 (1,13 – 2,48), $p=0,01$.

Comparamos también las medianas de tiempo post-trasplante (expresado en años) de conversión a imTOR entre los dos grupos de pacientes a estudio: los que presentaron P800 habían iniciado el imTOR en una mediana de 5,8 años (RIQ 1,4 – 10,7) post-trasplante, mientras que en el resto de pacientes se realizó la conversión en una mediana de 3,6 años (RIQ 1,1 – 9,3), siendo esta diferencia significativa estadísticamente ($p=0,016$).

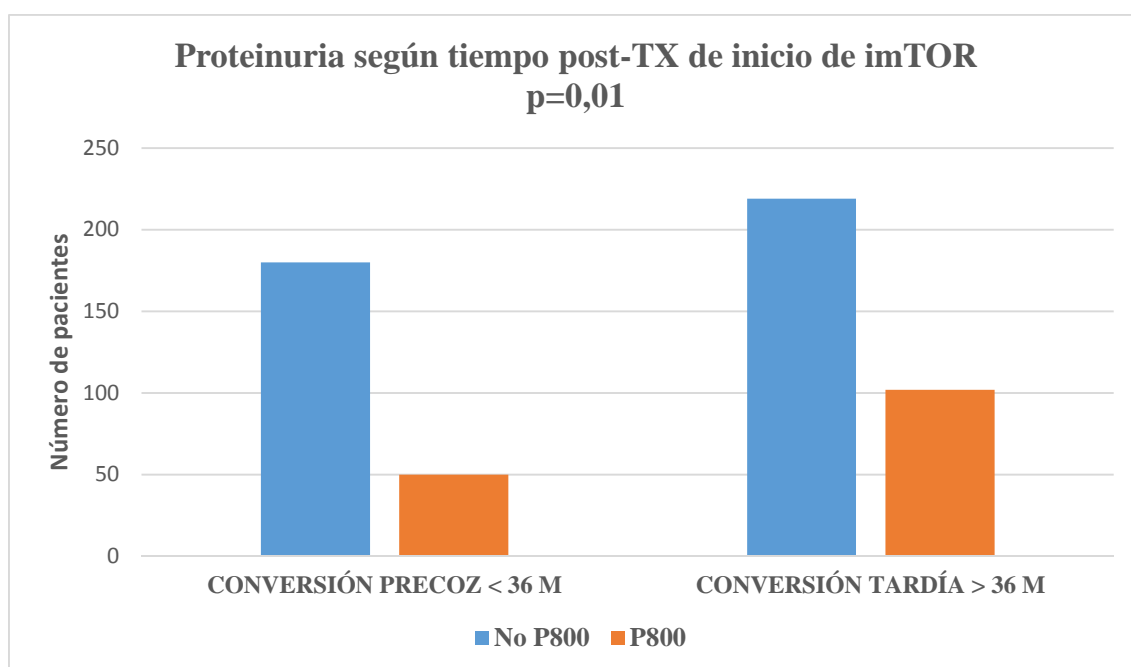


Figura 4. *Proteinuria (P800) en conversiones tempranas versus tardías.*

5.5.4 Edad del donante y del receptor

En cuanto a la edad del donante, se analizó si los más añosos, considerando 60 ó más años, tenían algún tipo de influencia en el desarrollo de proteinuria asociada a los imTOR (**Figura 5**). De 551 trasplantes renales analizados, 71 injertos (un 12,9%) procedían de donantes de más de 60 años de edad, frente a 480 (87,1%) procedentes de donantes más jóvenes. Desarrollaron P800 el 26,8% (19 casos) de los pacientes trasplantados de donante añoso frente a un 27,7% (133 casos) de los trasplantados de donantes menores de 60 años, no encontrándose de este modo diferencias significativas ($p=0,99$).

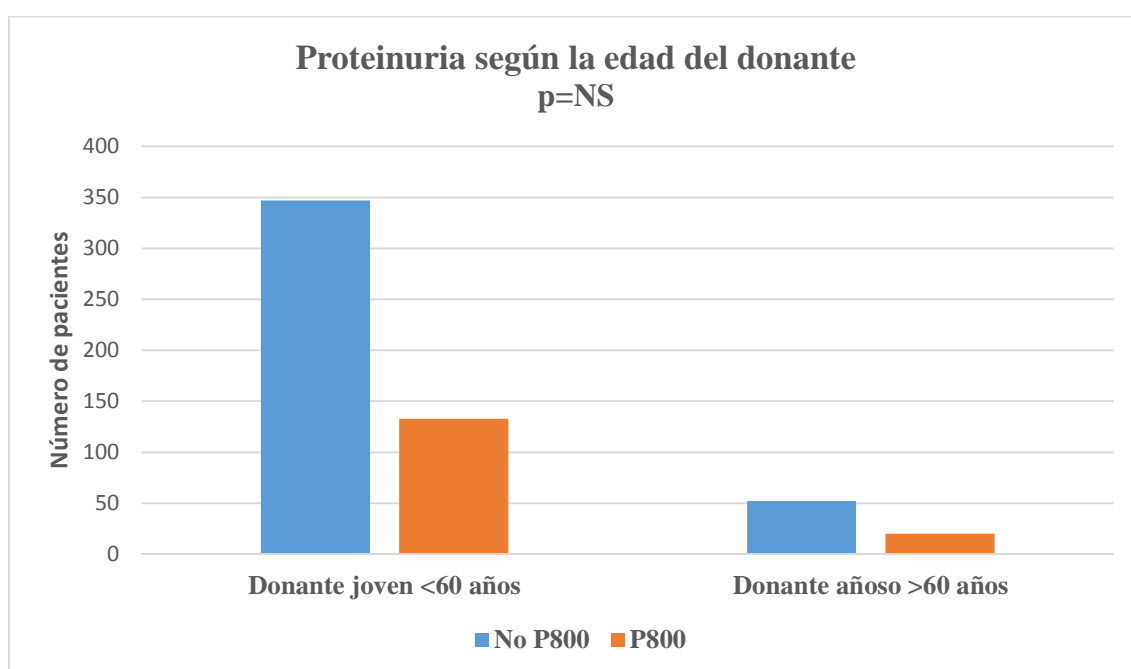


Figura 5. *Proteinuria (P800) según edad del donante.*

La variable “edad del donante”, además, no tuvo relación estadística con el desarrollo de proteinuria: en los pacientes con P800, la media de edad de los donantes fue de $40,3 \pm 17,9$ años, similar a la de los pacientes sin P800: $41,3 \pm 16,5$ años ($p=0,53$).

La edad del receptor al momento de la conversión a imTOR pudo tener cierta influencia en el desarrollo de proteinuria, obteniéndose los siguientes porcentajes de pacientes que presentaron P800: 31% (40 de 129 casos) en los menores de 45 años; 33,6% (41 de 122 casos) en los sujetos de entre 45 y 55 años; 20,9% (32 de 153 casos) en los de 55-65 años, y un 26,5% (39 de 147 casos) entre los mayores de 65 años, con $p=0,09$.

Se analizaron comparativamente, mediante la prueba t de Student, las medias de edad de los pacientes que presentaron P800 frente a los que no, siendo respectivamente de $54,3\pm 13,2$ años y $56,0\pm 13,3$ años; no se observaron diferencias significativas ($p=0,17$).

5.5.5 Primer trasplante versus re-trasplantes

Comparamos la aparición de P800 entre los pacientes que portaban un primer trasplante renal frente a los que ya han recibido 2 ó más riñones trasplantados (**Figura 6**), ya que estos últimos presentan, en general, un mayor riesgo inmunológico. Encontramos que desarrollaron P800 un 27,3% (129 de 472 casos) de los sujetos portadores de un primer trasplante renal, frente a un 29,1% (23 de 79 casos) de los enfermos que ya han sido trasplantados en al menos 2 ocasiones; no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,74$).

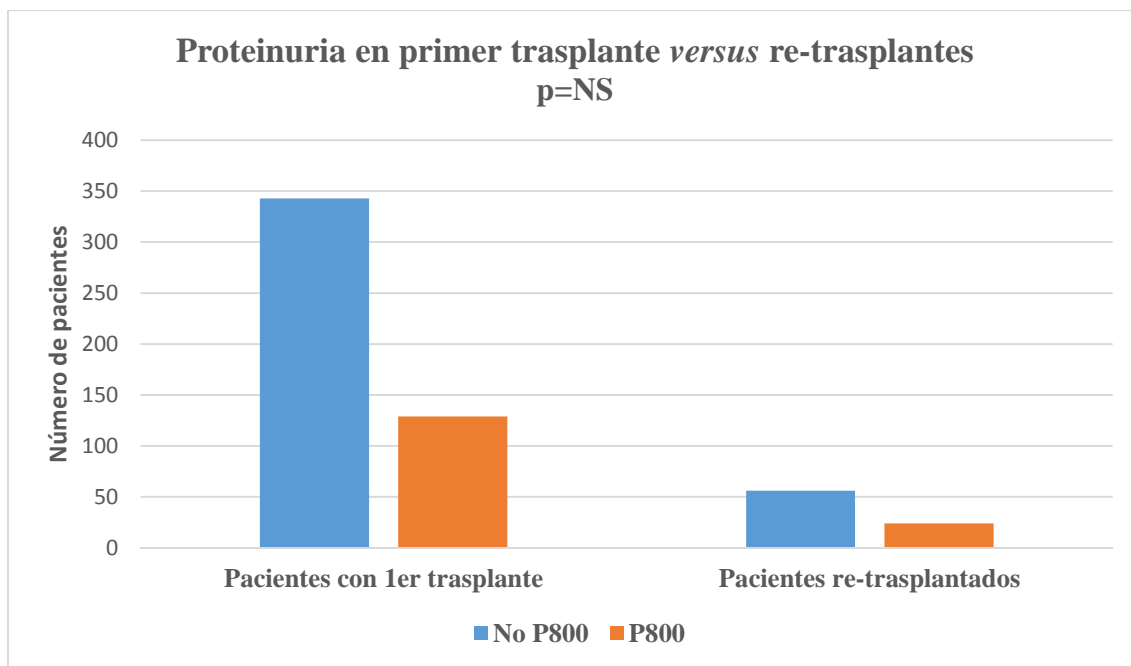


Figura 6. *Proteinuria (P800) en primeros trasplantes versus re-trasplantes.*

5.5.6 Etiología de la enfermedad de base

Analizamos también el desarrollo de proteinuria en función de la etiología de la enfermedad renal de base. Encontramos que presentaron P800 un 26,2% (11 de 42 casos) de los pacientes con nefropatía diabética, y un 25% (8 de 32 casos) de los pacientes diagnosticados de nefroangioesclerosis como enfermedad de base. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos etiológicos ($p=0,92$).

5.5.7 Sexo

Tampoco tuvo repercusión el sexo del paciente sobre la aparición de P800, evidenciada en un 24,3% de las mujeres (43 de 177 casos) y un 29,1% de los varones analizados (109 de 374 casos), de nuevo sin diferencias significativas ($p=0,22$).

5.5.8 Hiperlipidemia

Los pacientes con hipercolesterolemia basal (considerando ≥ 200 mg/dL) sí presentaron un riesgo de proteinuria 2,6 veces superior al resto en el análisis univariado. De los pacientes con cifra de colesterolemia basal controlada (< 200 mg/dL) presentó P800 un 22,8% (96 de 421 casos), frente a un 43,4% (56 de 129 enfermos) en los hipercolesterolémicos, siendo esta diferencia significativa, $p < 0,001$ (**Figura 7**).

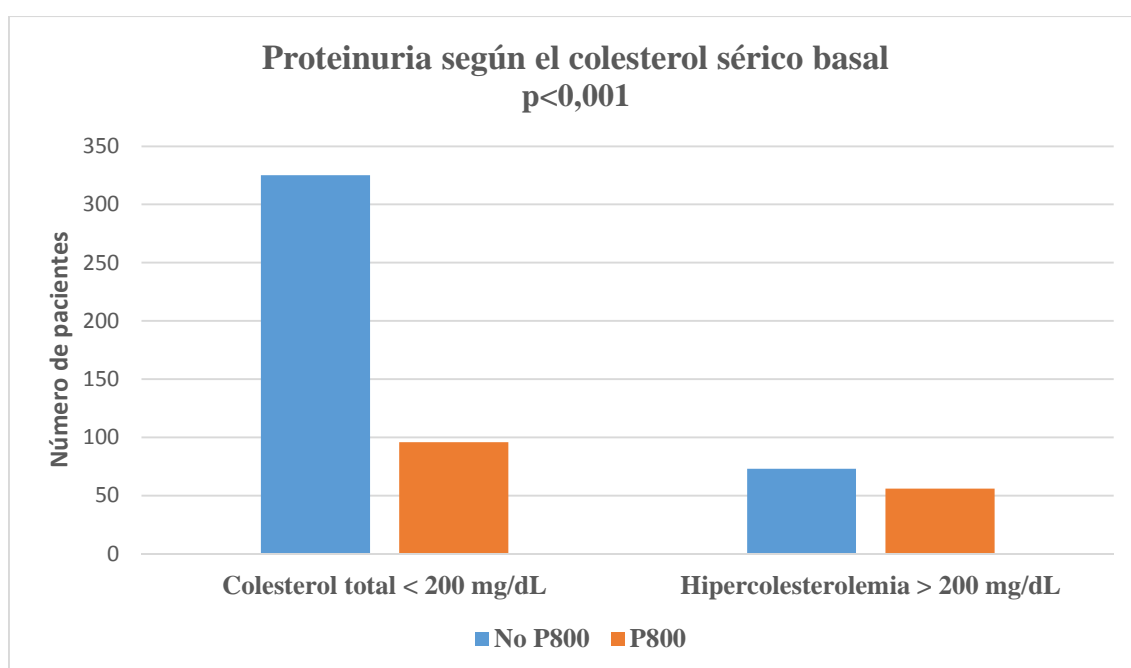


Figura 7. *Proteinuria (P800) según el colesterol basal.*

Con la trigliceridemia basal ocurrió algo similar. Los pacientes con hipertrigliceridemia (considerando ≥ 150 mg/dL) tuvieron casi el doble de riesgo de proteinuria: desarrollaron P800 el 37,1% (62 de 167 casos), que contrasta con un 23,6% (90 de 382 casos) de los pacientes con trigliceridemia basal controlada, con $p = 0,001$ (**Figura 8**).

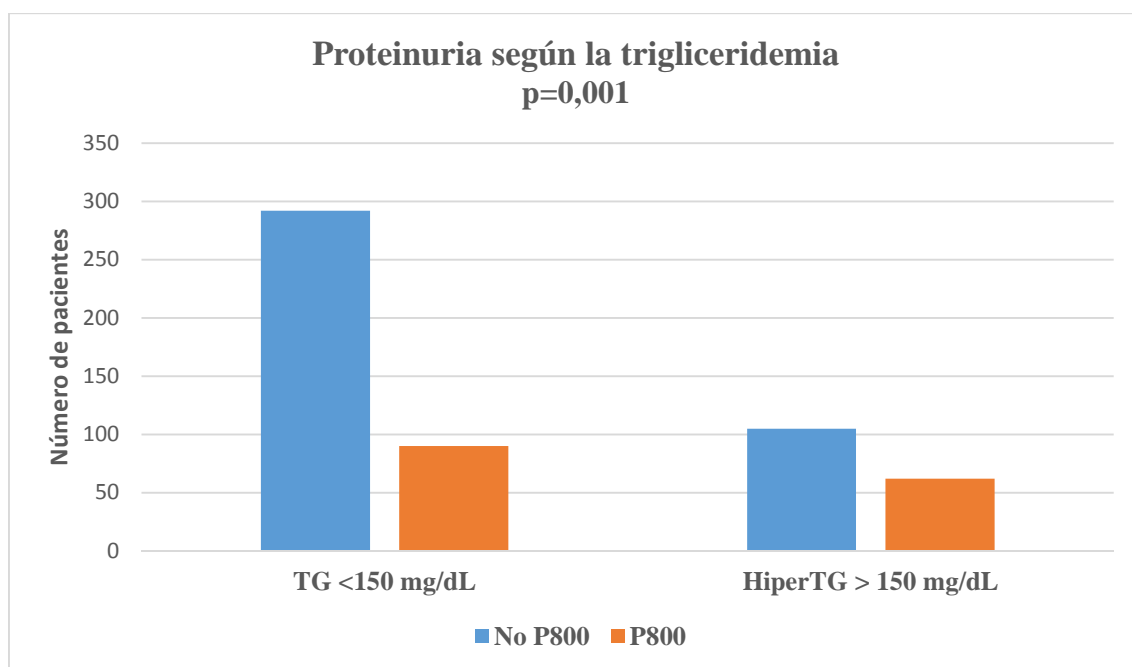


Figura 8. *Proteinuria (P800) según la trigliceridemia basal.*

5.5.9 Proteinuria pre-existente

Se analizó la aparición de P800 en función del valor de la proteinuria basal. Se categorizó en 3 grupos (menos de 300 mg/ 24h, entre 300 y 500 mg/ 24h y más de 500 mg/ 24h), siendo el riesgo de P800 cuatro veces mayor si la proteinuria basal es de 300-500 mg/ 24h y 10 veces mayor si es superior a 500 mg/ 24h, como se muestra en la Tabla 9 (p<0,001) .

Obtuvimos un resultado similar al categorizar la proteinuria basal de acuerdo a sus cuartiles:

- Menos de 150 mg/ 24h.
- 150-299 mg/ 24h.
- 300-499 mg/ 24h.
- Mayor o igual a 500 mg/24h.

Los porcentajes de P800 fueron, respectivamente, del 7,2% (10 de 138 casos), 14,3% (21 de 147 casos), 33,1% (39 de 118 casos) y 55,6% (80 de 144 casos), como se muestra en la **Figura 9**. Se observaron, por tanto, porcentajes de P800 crecientes a medida que la proteinuria basal es mayor ($p<0,001$).

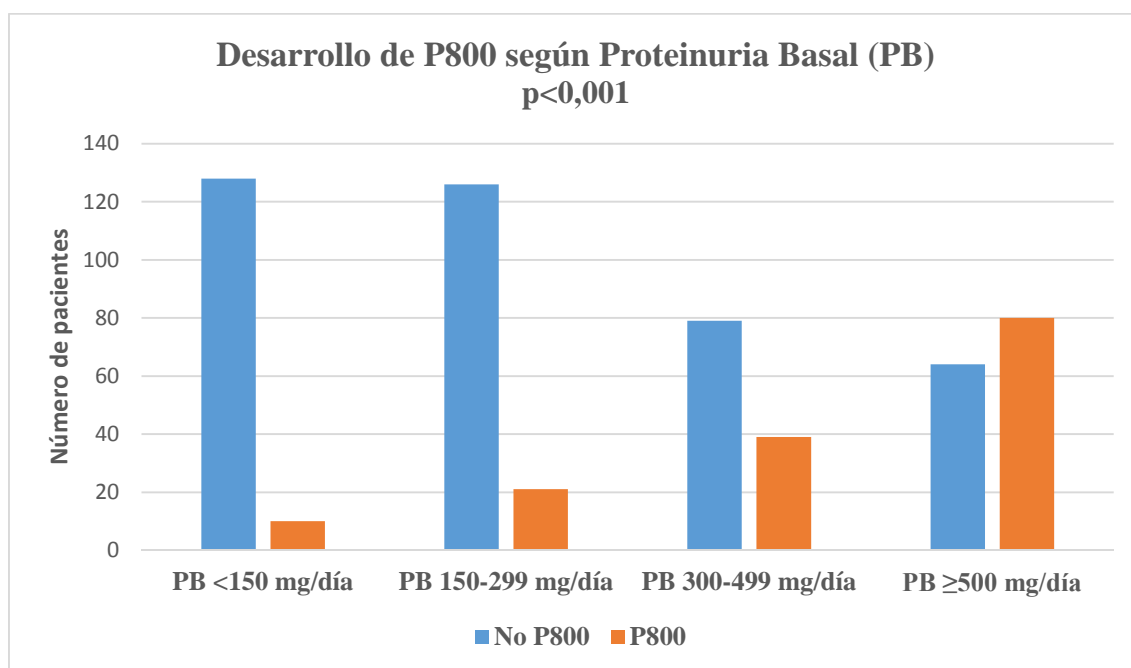


Figura 9. *P800 según el valor de proteinuria basal (PB) categorizada por cuartiles.*

Cruzamos los resultados de proteinuria y CKD-EPI basal y riesgo de P800, mostrados en la **Figura 10**. Dentro de cada rango de filtrado glomerular, los porcentajes de P800 crecen cuanto mayor es la proteinuria basal (considerando respectivamente <300, 300-500 y >500 mg/ 24h): TFG basal <35 mL/min (20,3%, 37,2%, 67,6%); rango 35-50 mL/min (12,9%, 45,5%, 52,4%) y TFG >50 mL/min (5,3%, 19%, 35,3%), $p<0,001$.

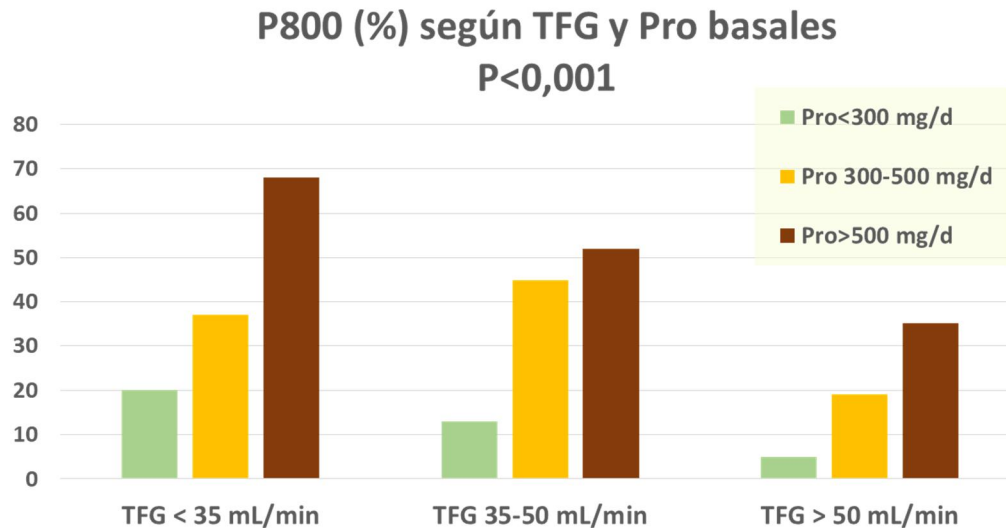


Figura 10. *Porcentaje de P800 en función de la TFG y proteinuria basales.*

5.5.10 Otros factores relacionados con el tratamiento inmunosupresor

También encontramos relación entre el uso de corticoesteroides y la aparición de proteinuria en este contexto (**Figura 11**). De los pacientes que recibían prednisona, presentó P800 un 31,4% (102 de 325 casos), que contrasta con sólo un 22,1% (50 de 226 casos) de P800 entre los trasplantados renales que no estaban en tratamiento corticoideo. El tratamiento con prednisona implicó 1,61 (1,09 – 2,38) veces más riesgo de desarrollar P800, $p=0,017$ (Tabla 9).

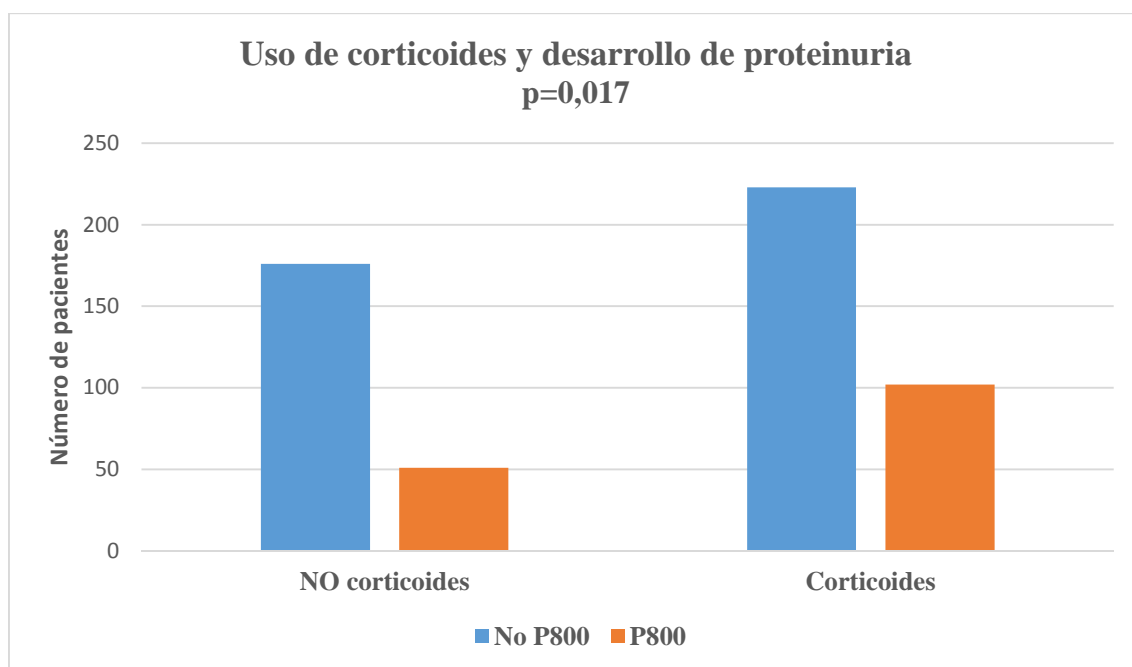


Figura 11. *Toma de corticoides y desarrollo de proteinuria (P800).*

No encontramos relación, en cambio, con el uso de micofenolato (mofetil o sódico). Se observó P800 en el 30,1% de los pacientes que no recibían tratamiento con micofenolato (47 de 156 casos) y en el 26,6% de los que sí lo recibían (105 de 395 casos), sin observarse diferencias estadísticamente ($p=0,40$).

En cuanto a los pacientes que continuaron el tratamiento con ICN, no encontramos una disminución del riesgo de proteinuria. Presentaron P800 un 25,3% (21 de 83 casos) de los trasplantados en terapia combinada, frente a un 28,0% (131 de 468 casos) de los pacientes convertidos de ICN a imTOR, sin objetivarse diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,61$). Comparamos también las medias de proteinuria al año entre ambos subgrupos: en los casos de conversión a imTOR la media fue de $815,0 \pm 1210,6$ mg/24h, y en los de tratamiento combinado $655,2 \pm 791,8$ mg/ 24h; no observamos diferencias significativas ($p=0,26$).

5.5.11 Bloqueo del sistema renina-angiotensina

En cuanto al uso de fármacos bloqueantes del sistema renina-angiotensina (SRA), considerando IECA y ARA II, 304 de los 551 sujetos analizados para proteinuria (un 55,2%) recibían al menos 1 fármaco de ese tipo en el momento basal.

El 32,2% (N=98 casos) de los tratados con bloqueo del SRA presentó P800. En cambio, de los 247 que no recibían ningún bloqueante del SRA al momento de la conversión, se detectó P800 en el 21,9% (N=54). El riesgo promedio de presentar P800 fue 1,70 (1,16 – 2,50) veces mayor en los sujetos tratados con bloqueo del SRA basalmente $p=0,007$ (Tabla 9).

Tras 1 año de tratamiento con imTOR, comparamos de nuevo a los enfermos que recibían bloqueantes del SRA frente a los que no recibían ningún fármaco de ese tipo: encontramos un 30% de pacientes con P800 (98 de 327 casos) entre los que recibían bloqueo del SRA frente a un 15,5% de detección de P800 entre los que no lo recibían (29 de 187 casos), con una $p<0,001$ (**Figura 12**). El uso de este tipo de fármacos antiproteinúricos aumentó porcentualmente de un 55,2% basal a un 63,6% al año de la conversión a imTOR (327 de un total de 514 sujetos; con 37 pérdidas respecto a los datos basales de uso del bloqueo del SRA).

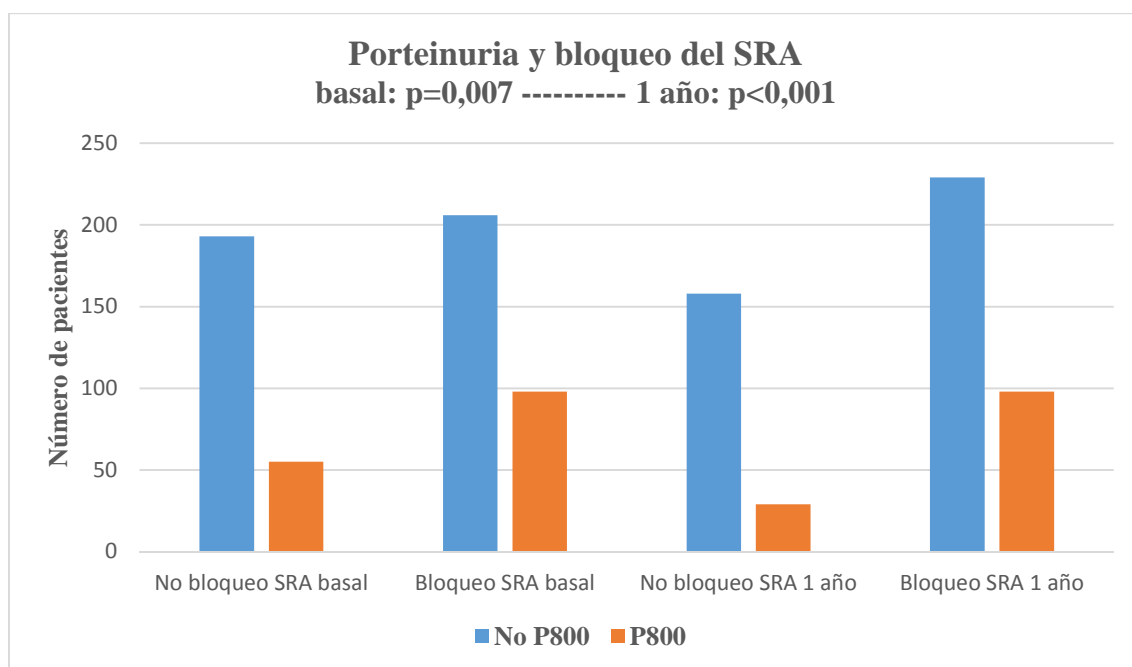


Figura 12. *Bloqueo del SRA y proteinuria (P800).*

5.5.12 Anticuerpos donante-específicos

Se realizaron determinaciones de ADEs en 442 pacientes durante el seguimiento, y fueron detectados de novo (después de la introducción del imTOR) en un total de 113 (un 25,6% de los testados y un 20,5% de la muestra total).

Aunque hubo un mayor porcentaje de P800 entre los pacientes que desarrollaron ADEs post-imTOR (un 31%, 13 de 42 casos) versus los que no (25%, 100 de 400 casos), la detección de estos anticuerpos no comportó un aumento estadísticamente significativo del riesgo de proteinuria (OR 1,35 [0,67 – 2,69], $p=0,4$).

5.6 Análisis univariado para P800 según los SNP del gen del VEGF

5.6.1 Polimorfismo VEGF -1154 G>A

Obtuvimos los resultados de proteinuria y genotipado del *single nucleotide polymorphism* (SNP) en la posición -1154 del gen del VEGF en 408 pacientes (perdidos 175, un 30% del muestra inicial).

Se detectó P800, como se muestra en la Tabla 11, en el 20,1% de sujetos heterocigotos G/A (32 de 159 casos), en el 27,1% de los homocigotos G/G (56 de 207 casos) y en el 26,2% (11 de 42 casos) de los pacientes portadores del genotipo homocigoto mutado A/A. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,30$).

Tabla 11. Proteinuria (P800) según SNP -1154.

Polimorfismo	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
SNP -1154	99/408 (24,3%)		0,297
G/G	56/207 (27,1%)	1,47 (0,90-2,41)	0,125
G/A	32/159 (20,1%)	1	
A/A	11/42 (26,2%)	1,41 (0,64-3,10)	0,395

Sin embargo, se objetivó un porcentaje de P800 inferior en los pacientes heterocigotos G/A, por lo que comparamos el desarrollo de proteinuria al año en estos pacientes frente al resto de pacientes homocigotos (G/G y A/A) para este SNP (Tabla 12). El porcentaje

observado de P800 fue del 20,1% en heterocigotos frente a un 26,9% en los pacientes homocigotos, pero sin significación estadística ($p=0,12$).

Tabla 12. P800 en heterocigotos vs homocigotos para -1154.

SNP -1154	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
Heterocigosis G/A	32/159 (20,1%)	1	
Resto homocigotos	67/249 (26,9%)	1,46 (0,91-2,36)	0,12

Por otro lado, ser portador del **alelo G** no conllevó un cambio en el riesgo de proteinuria (OR 0,89 [0,43-1,85], $p=0,76$), al igual que ocurrió con el **alelo A** (OR 0,73 [0,47-1,16], $p=0,18$).

5.6.2 Polimorfismo VEGF -2578 C>A

En cuanto al SNP en la posición -2578 del gen del VEGF, completamos el estudio de secuenciación del mismo y de proteinuria en un total de 411 pacientes (172 casos perdidos, 29,5%).

Como se muestra en la Tabla 13, presentaron P800 el 26,9% de los pacientes homocigotos C/C (32 de 119 casos) y el 25% de los homocigotos mutados A/A (22 de 88 casos), frente a un menor porcentaje de P800 en los heterocigotos A/C: un 22,1% (45 de 204 casos).

Tabla 13. Proteinuria (P800) según SNP -2578.

Polimorfismo	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
VEGF -2578	99/411 (24,1%)		0,604
C/C	32/119 (26,9%)	1,30 (0,77-2,20)	0,326
A/C	45/204 (22,1%)	1	
A/A	22/88 (25,0%)	1,18 (0,66-2,11)	0,584

Volvimos a comparar si los trasplantados renales portadores del genotipo heterocigoto A/C en la posición -2578 presentaban un riesgo menor de desarrollar proteinuria al año post-imTOR frente al resto de sujetos homocigotos (Tabla 14), pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,34$) entre pacientes heterocigotos (22,1% de P800) y el resto (26,1% de P800) para este polimorfismo.

Tabla 14. P800 en heterocigotos vs homocigotos para -2578.

VEGF -2578	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
Heterocigosis A/C	45/204 (22,1%)	1	
Resto homocigotos	54/207 (26,1%)	1,25 (0,79-1,96)	0,34

Analizamos también si ser portador del **alelo A** (OR 0,81 [0,50-1,32], $p=0,40$) o del **alelo C** (OR 0,94 [0,54-1,62], $p=0,82$) fue factor de riesgo de proteinuria sin evidenciar diferencias estadísticas en un sentido u otro.

5.6.3 Polimorfismo VEGF +936 C>T

Del conjunto de pacientes con el SNP secuenciado en la posición +936 del gen del VEGF, se completó el estudio de proteinuria en 409 sujetos (174 casos perdidos, un 29,8% sobre la N total).

Desarrollaron P800 un 26,3% de los pacientes portadores de homocigosis C/C (81 de 308 casos) y un 27,3% de los homocigotos mutados T/T (3 de 11 casos), frente a sólo un 16,7% de los genotipos C/T para el SNP +936 (15 de 90 casos), como se detalla en la Tabla 15. La diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,17$).

Tabla 15. Proteinuria (P800) según SNP +936.

Polimorfismo	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
VEGF +936	99/409 (24,2%)		0,173
C/C	81/308 (26,3%)	1,78 (0,97-3,28)	0,063
C/T	15/90 (16,7%)	1	
T/T	3/11 (27,3%)	1,88 (0,45-7,90)	0,392

Dado el escaso número de sujetos con genotipo T/T en la muestra, comparamos los pacientes heterocigotos C/T para este SNP frente a los pacientes con genotipo natural o *wild type* (C/C). Encontramos una diferencia, cercana a la significación estadística, de tendencia a mayor riesgo de P800 entre los homocigotos C/C (81 de 308 casos, un 26,3%) con respecto a los portadores del genotipo heterocigoto C/T (**Figura 13**, Tabla 16). En el análisis de regresión logística univariado, ser portador del genotipo C/C en +936 tuvo una OR de 1,78 (IC 95% 0,97-3,28), con $p=0,063$.

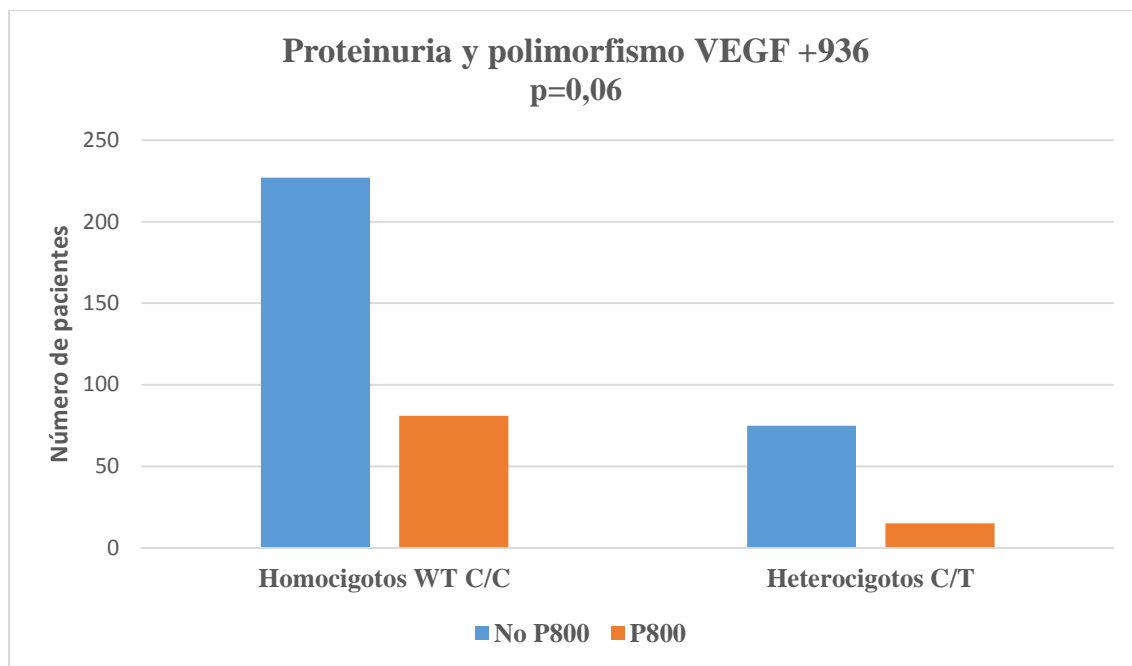


Figura 13. *Proteinuria (P800) en heterocigotos +936 VEGF vs homocigotos.*

Tabla 16. P800 en heterocigotos C/T vs homocigotos *wild type* para +936.

VEGF +936	Desarrollo de P800	Odds ratio (95% IC)	p valor
Heterocigotos C/T	15/90 (16,7%)	1	
Homocigotos C/C	81/308 (26,3%)	1,78 (0,97-3,28)	0,063

Si analizamos a todos los portadores del **alelo T** en la posición +936 (es decir, incluimos los once casos de genotipo T/T) encontramos una presencia de P800 del 17,8% (18 de 101 casos) frente al 26,3% que presentaron los homocigotos C/C, por lo que ser portador del alelo +936T estuvo estadísticamente cerca de comportarse como factor protector de proteinuria: OR 0,61 [0,34-1,07], p=0,086).

5.7 Análisis multivariado para proteinuria

Para el análisis de regresión logística multivariado de la variable respuesta P800 se construyó un modelo máximo inicial que incluyó las variables que mostraron asociación significativa (considerando $p < 0,10$) en el univariado:

- TFG basal (clasificado en <35 , $35-50$ y >50 mL/minuto), $p < 0,001$.
- Proteinuria basal (clasificada en <300 , $300-499$ y ≥ 500 mg/día), $p < 0,001$.
- Edad al inicio del imTOR: dividida en <45 , $45-54$, $55-64$ y ≥ 65 años, $p = 0,09$.
- Tiempo post-trasplante de inicio del imTOR ≥ 36 meses: Sí/No, $p = 0,01$.
- Toma de corticoides: Sí/No, $p = 0,017$.
- Toma de bloqueantes del SRA en el momento basal: Sí/No, $p = 0,007$.
- Hipercolesterolemia ≥ 200 mg/dL: Sí/No, $p < 0,001$.
- Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL: Sí/No, $p = 0,001$.

También se incluyeron en el modelo dos de las variables de mayor interés para nuestra investigación:

- SNP +936 C>T: genotipos CC, CT y TT.
- SNP -1154 G>A: genotipos GG, GA y AA.

El polimorfismo +936 mostró, en el análisis univariado, tendencia a un menor riesgo de proteinuria en los pacientes con genotipo C/T (o bien, en los portadores del alelo +936T, si incluimos el pequeño porcentaje de sujetos T/T). En cuanto al SNP -1154 G>A, algunas de las diferencias encontradas en el estudio univariado de este polimorfismo estuvieron cerca de la significación estadística ($p = 0,12$). Por tanto, dados los objetivos de esta investigación, decidimos analizar si alguno de los genotipos de este SNP pudo presentar

más riesgo de proteinuria. Por otro lado, la variable “ADEs post” (detección de ADEs posterior a la introducción del imTOR) no fue incluida para el ajuste del modelo debido a que no produjo diferencias significativas en el análisis univariado, además de que contribuiría a reducir la N del análisis multivariable.

En cuanto a los resultados del análisis multivariado (Tabla 17), permanecieron en el modelo como factores importantes de riesgo de P800 una función renal deteriorada y una mayor proteinuria de base. Los pacientes con una TFG basal de 35-50 mL/min presentaron una Odds ratio (OR) de 2,77 (IC al 95%: 1,28 – 5,98), $p=0,01$, y los que tenían peor función renal de base (<35 mL/min) cuadruplicaron el riesgo de proteinuria: OR de 3,96 (1,84 – 8,54), $p=0,002$, respecto a los trasplantados que partieron de una TFG superior a 50 mL/min. En los sujetos con proteinuria basal de 300-500 mg/día el riesgo de P800 fue más de 5 veces mayor que los que presentaban basalmente <300 mg/día (OR 5,61 [2,78 – 11,31], $p<0,001$); mientras que en proteinurias basales superiores a medio gramo diario el riesgo se multiplicó por 10 (OR 10,35 [5,22 – 20,53]).

Una edad mayor del receptor al iniciar el imTOR fue factor de protección (por cada año más, OR 0,97 (0,95 – 0,99), $p=0,016$), mientras que por cada año postrasplante transcurrido hasta la introducción del imTOR se incrementó ligeramente el riesgo de proteinuria (OR 1,05 [1,00 – 1,11], $p=0,046$).

Tabla 17 Análisis de regresión logística multivariado para P800*

Variable analizada	Odds ratio (IC 95%)	p valor
TFG basal		0,002
- > 50 mL/min	1	
- 35-50 mL/min	2,77 (1,28 – 5,98)	0,01
- < 35 mL/min	3,96 (1,84 – 8,54)	0,002
Proteinuria basal		<0,001
- < 300 mg/día	1	
- 300-500 mg/día	5,61 (2,78 – 11,31)	<0,001
- > 500 mg/día	10,35 (5,22 – 20,53)	<0,001
Edad al iniciar imTOR	0,973 (0,952 – 0,995)	0,016
Tiempo postrasplante de conversión (años)	1,05 (1,00 – 1,11)	0,046
Colesterolemia basal		
- < 200 mg/dL	1	
- ≥ 200 mg/dL	1,88 (1,01 – 3,50)	0,047
Trigliceridemia basal		
- < 150 mg/dL	1	
- ≥ 150 mg/dL	2,28 (1,28 – 4,06)	0,005
Bloqueo del SRA basal		
- No	1	
- Sí	2,28 (1,21 – 4,28)	0,01
SNP +936 C>T		0,044
- CC	2,36 (1,13 – 4,93)	0,022
- CT	1	
- TT	4,58 (0,84 – 24,96)	0,079

*Modelo ajustado para las variables “corticoides” y “SNP -1154 G>A”

La hipercolesterolemia basal supuso cerca del doble de riesgo (OR 1,88 [1,01 – 3,50], p=0,047) y la hipertrigliceridemia más del doble de riesgo de promedio (OR 2,28 [1,28 – 4,06], p=0,005) de desarrollar P800.

Ser portador del genotipo C/C para el SNP +936 C>T del gen del VEGF se comportó como factor de riesgo de proteinuria post-imTOR; el riesgo promedio de P800 fue superior al doble en estos pacientes: OR 2,36 (1,13 – 4,93), $p=0,022$. La comparación de diferencias entre el genotipo C/T y el T/T mutado no fue significativa ($p=0,08$).

Las variables “toma de corticoides” y “SNP -1154 G>A” no permanecieron en el modelo al perder significación estadística.

El modelo ajustado final mostró una buena capacidad discriminativa, con un Área Bajo la Curva (AUC) ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de 0,845, con un IC al 95%: 0,80-0,89, $p<0,001$ (**Figura 14**).

La Especificidad del modelo predictivo fue de 0,792 y la Sensibilidad de 0,818. El valor o clasificación global del modelo fue del 79,8%.

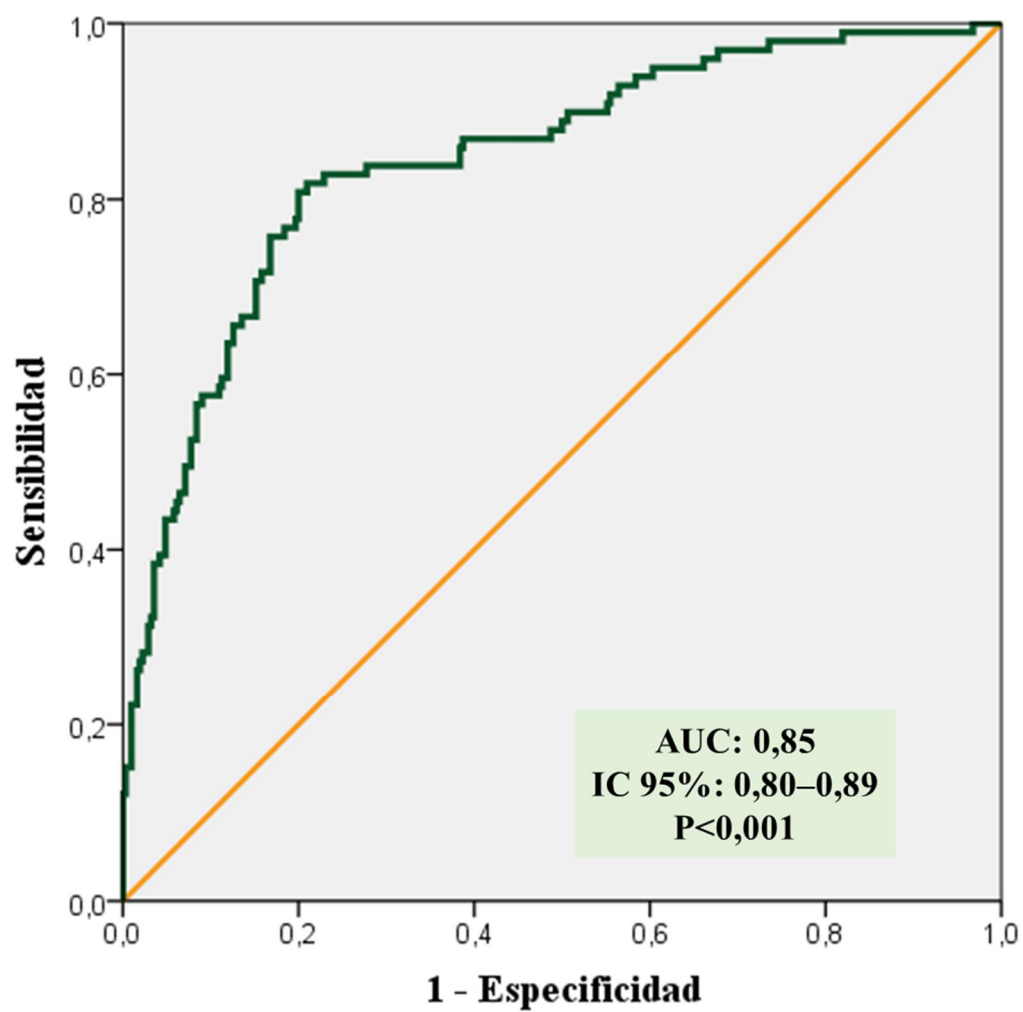


Figura 14. *Curva ROC del modelo predictivo de proteinuria al año post-imTOR*

5.8 Discontinuación del inhibidor m-TOR

Un total de 205 sujetos (un 35,2%) tuvieron que discontinuar el tratamiento con imTOR durante el estudio. Este evento ocurrió en una mediana de tiempo de 19,8 meses (RIQ, 7,8-45,1) desde el inicio del fármaco.

La proteinuria fue el motivo de suspensión más frecuente, responsable en un total de 45 casos (7,7%). Por orden de frecuencia, destacaron las siguientes causas: neumonitis en 42 casos (7,2%), deterioro de función renal en 20 (3,4%), cuadro infeccioso en 17 (2,9%) y problemas en relación a procesos que requerían cicatrización en 15 (2,6%). El resto de causas de discontinuación del tratamiento se detallan en la Tabla 18.

Tabla 18. Causas de discontinuación del Inhibidor m-TOR.

Motivo de suspensión	N	% sobre el total	% sobre suspensiones
Proteinuria	45	7,7	22,0
Neumonitis	42	7,2	20,5
Deterioro de función renal	20	3,4	9,8
Cuadro infeccioso	17	2,9	8,3
Mala cicatrización	15	2,6	7,3
Edemas / linfedema	6	1	2,9
Anemia	5	0,9	2,4
Embarazo	5	0,9	2,4
Erupción cutánea	4	0,7	2,0
Úlceras	2	0,3	1,0
Otras causas	44	7,5	21,5
TOTAL suspendidos	205	35,2	100
NO SUSPENSIÓN	378	64,8	-

Por otra parte, la proteinuria se asoció a una tasa significativamente mayor de discontinuación del imTOR (**Figura 15**). Encontramos un 48% de suspensiones del tratamiento entre los pacientes que presentaron P800 (73 de 152 casos), frente a un 30,8% entre los trasplantados que no desarrollaron esa proteinuria (123 de 399 casos), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$).

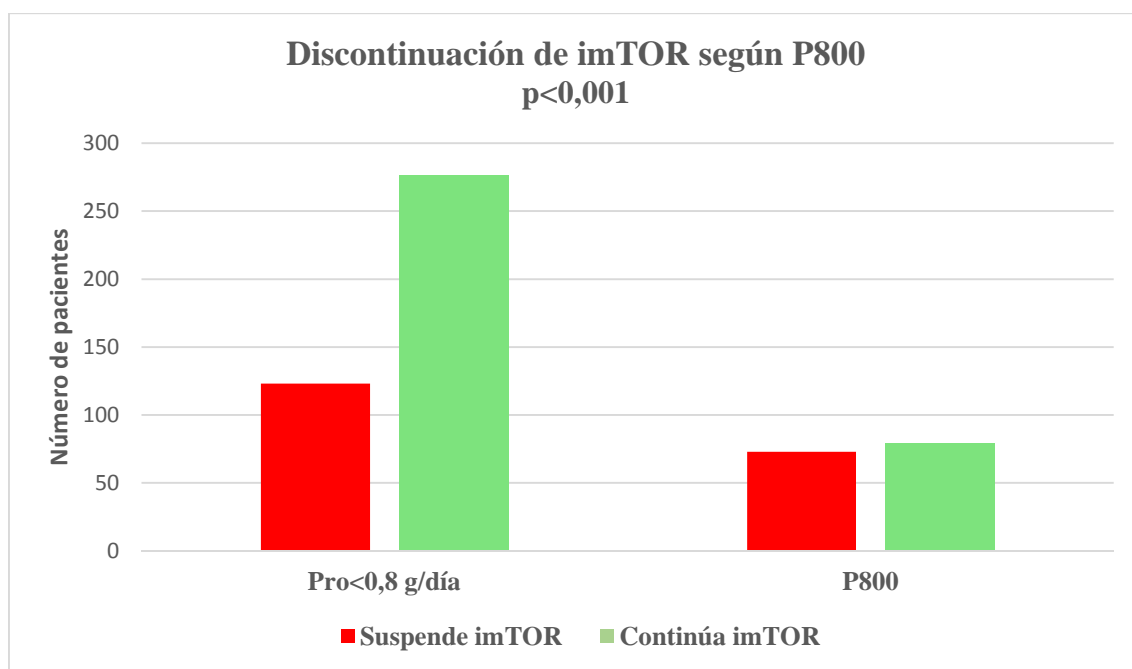


Figura 15. *Suspensiones del tratamiento imTOR según proteinuria.*

Presentar P800 supuso para el paciente trasplantado el doble de riesgo de discontinuar el imTOR: OR 2,07, IC 95% 1,41-3,04, p<0,001.

5.9 Pérdida de la función renal del injerto

Durante el seguimiento realizado (mediana de 76,5 [RIQ 45,1-111,0] meses), 117 de los 583 sujetos a estudio (un 20,1%) perdieron la función del riñón trasplantado. Se censuraron las pérdidas de injerto renal funcionante por fallecimiento del paciente.

Las principales causas de pérdida de función del injerto se recogen en la Tabla 19. La más frecuente fue la fibrosis intersticial y atrofia tubular de origen inespecífico (FIAT-i), a la que se atribuyeron 78 pérdidas (13,4% sobre la N total); le siguen 22 pérdidas (3,8%)

secundarias a un cuadro de rechazo crónico humoral o mediado por anticuerpos, y 5 (0,9%) en relación a recidiva de la enfermedad glomerular primaria del paciente.

Tabla 19. Causas de pérdida del injerto renal.

Causa de pérdida del injerto	N	% sobre el total	% sobre pérdidas
FIAT-i	78	13,4%	66,7%
Rechazo humoral / crónico activo	22	3,8%	18,8%
Recidiva de glomerulonefritis	5	0,9%	4,3%
Nefropatía por virus BK	3	0,5%	2,6%
Rechazo agudo	2	0,3%	1,7%
Complicación quirúrgica	1	0,2%	0,9%
Otras causas	6	1%	5,1%
TOTAL	117	20%	100%

5.9.1 Supervivencia del injerto según proteinuria

Se analizó una N total de 551 sujetos. Encontramos 64 pérdidas de injertos funcionantes entre los 152 pacientes que desarrollaron P800, por lo que su supervivencia fue del 58,2% durante una mediana de seguimiento de 81,0 (RIQ 48,5-112,4) meses. Este dato contrasta con las 44 pérdidas de los 399 pacientes restantes que no alcanzaron P800, con una supervivencia del injerto del 89% al final del estudio (**Figura 16**).

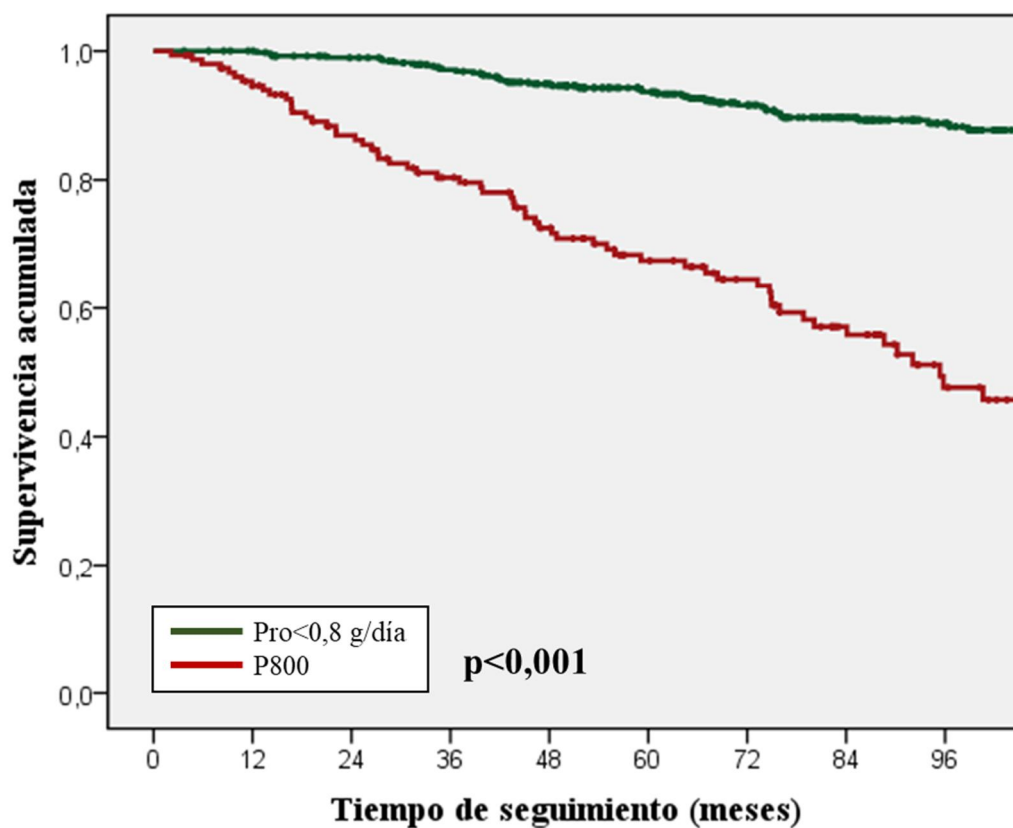


Figura 16. Supervivencia del Injerto según proteinuria.

Se estimó, por Kaplan-Meier, una supervivencia del injerto media de los trasplantados que no presentaron P800 de $176,0 \pm 3,1$ meses; frente a una estimación de $112,4 \pm 7,2$ meses en los que desarrollaron P800, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,001$).

En el análisis de regresión de Cox, los pacientes P800 presentaron una tasa de incidencia de pérdida del injerto más de 5 veces superior: Hazard Ratio (HR) 5,5 (IC 95%: 3,7-8,0), $p < 0,001$.

5.9.2 Supervivencia del injerto según polimorfismos del VEGF

Comparamos la supervivencia del injerto renal (censurando muerte) en función de los tres SNP del gen del VEGF estudiados.

SNP -1154G > A: En el análisis multivariado no encontramos relación estadística entre este SNP o sus alelos y la proteinuria. Sin embargo, sí encontramos tendencia a mejor supervivencia del injerto en los pacientes homocigotos A/A para este polimorfismo, que fue del 90,9%, frente a un 78,6% de los homocigotos G/G (*wild-type*) y un 81,5% de los heterocigotos G/A, aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0,195$, **Figura 17**).

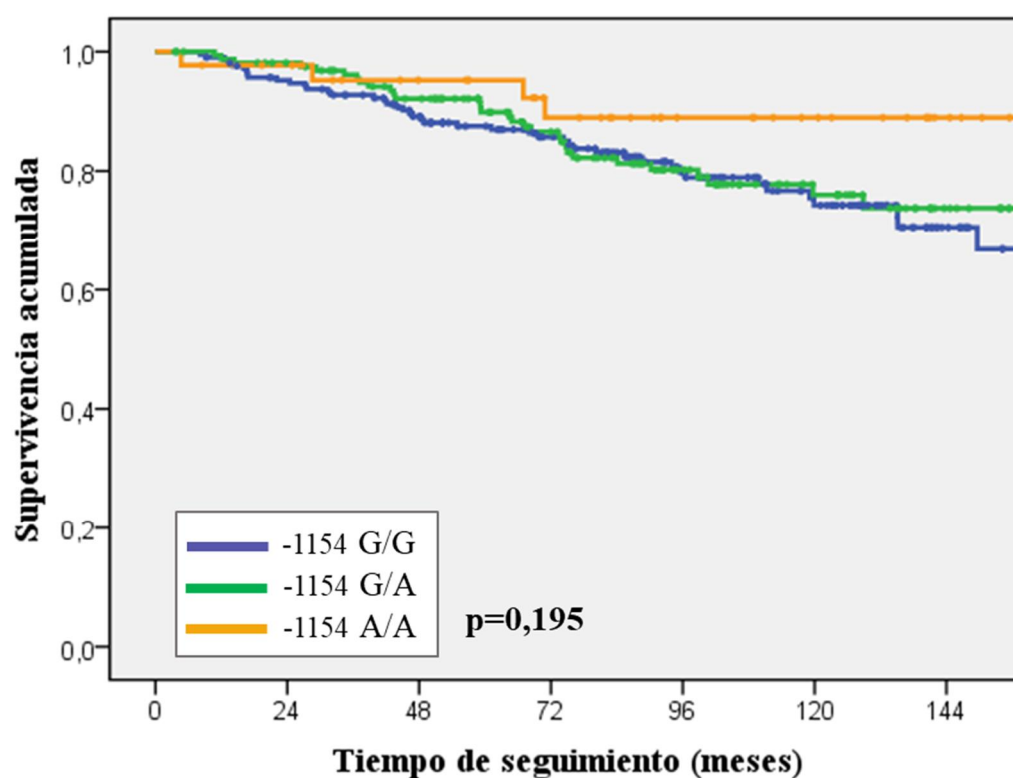


Figura 17. *Supervivencia del Injerto según SNP -1154.*

La supervivencia media estimada del injerto fue de $179,7 \pm 7,8$ meses en los homocigotos A/A, frente a $157,2 \pm 5,2$ meses en los homocigotos G/G y $154,6 \pm 4,9$ en los heterocigotos G/A.

Analizamos también, por el método de Kaplan-Meier (KM), la influencia de portar el alelo -1154G sobre las pérdidas de riñón trasplantado funcionante. Encontramos una menor supervivencia del injerto en los portadores del alelo G: media estimada de $159,6 \pm 3,9$ meses (79,8% de riñones funcionantes al final del estudio) vs. $179,7 \pm 7,8$ meses en los no portadores (90,9% de injertos funcionantes). Los datos de peor supervivencia del injerto en los portadores de -1154G estuvieron cerca de alcanzar la significación estadística: $p=0,084$ (**Figura 18**).

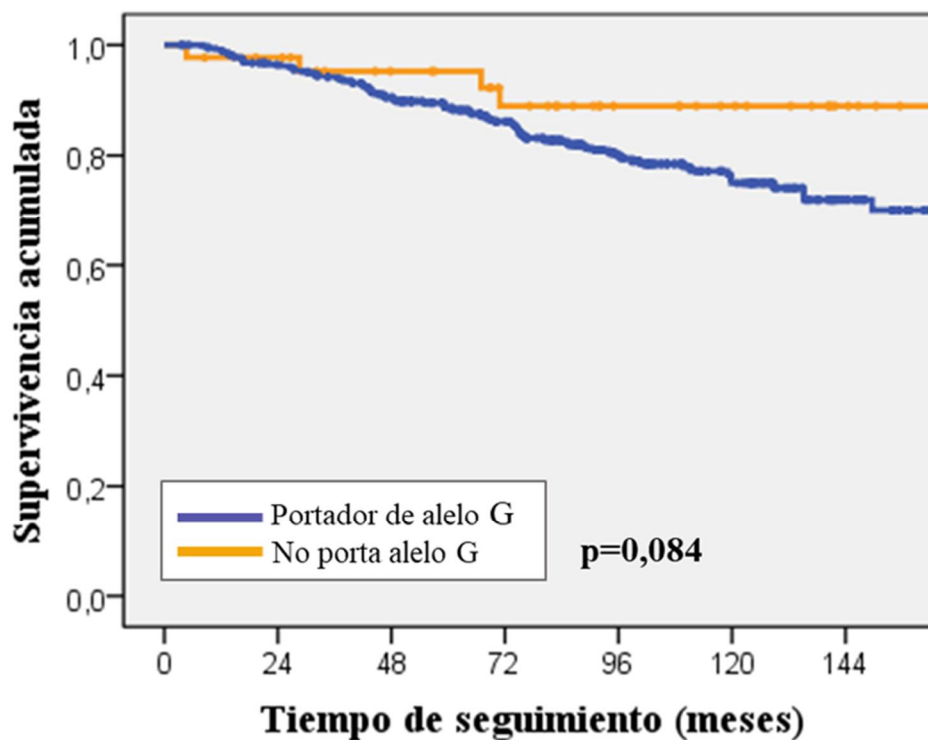


Figura 18. *Supervivencia del Injerto según alelo -1154G.*

Contrastamos la incidencia de ADEs post-imTOR, que fue superior en pacientes portadores del alelo -1154G: 11% (40 de 365 casos), frente a los no portadores (genotipo -1154 A/A): 2,3% (1 de 44 casos), y estuvo cerca de la significación estadística: $p=0,07$.

SNP -2578C > A: No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las pérdidas de riñones funcionantes. Las tres combinaciones posibles de alelos mostraron porcentajes similares de supervivencia del injerto al final del seguimiento: 80,2% los homocigotos C/C *wild-type* (supervivencia media estimada de $160,5 \pm 6,1$ meses), 81,9% los heterocigotos A/C ($163,4 \pm 4,9$ meses) y 80,7% los homocigotos mutados A/A ($162,7 \pm 7,2$ meses).

SNP +936C > T: Tampoco evidenciamos diferencias significativas en el caso de este polimorfismo ($p=0,25$, **Figura 19**). Observamos los siguientes datos de supervivencia del injerto:

- +936 C/C: 81,3% de injertos funcionantes al final del estudio (256 de 315 casos).
- +936 C/T: 79,1% de riñones funcionantes (72 de 91 casos).
- +936 T/T: 100% de riñones funcionantes (11 de 11 casos).

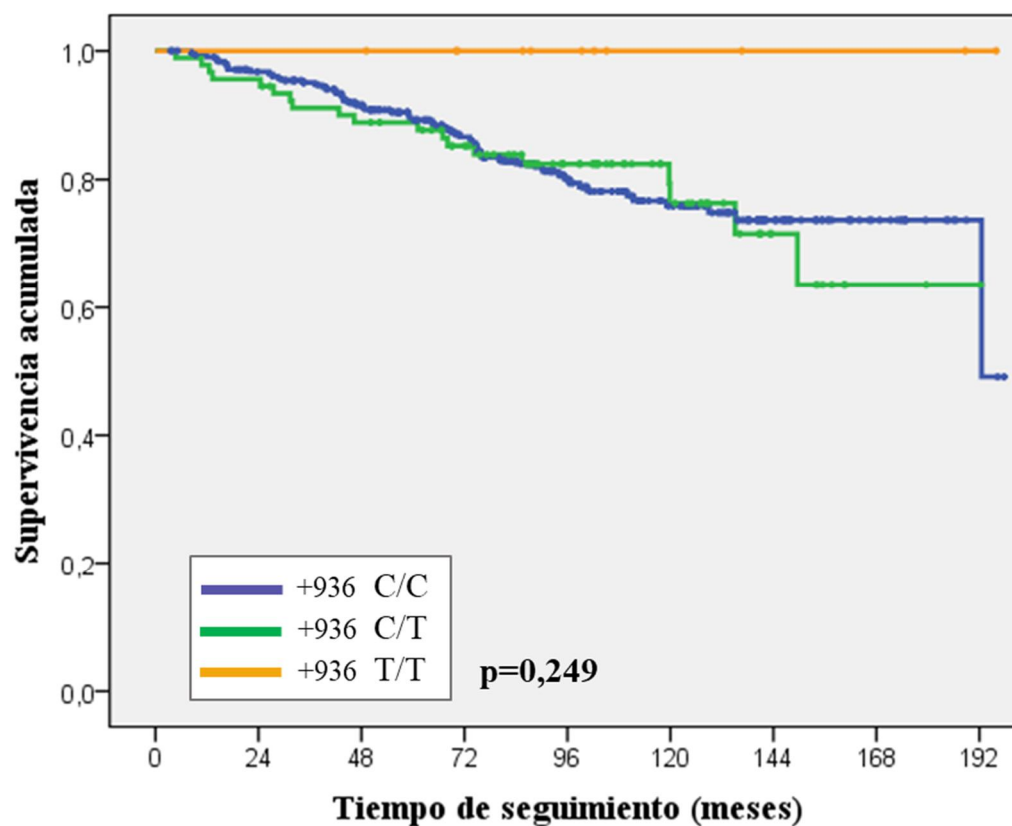


Figura 19. *Supervivencia del Injerto según SNP +936.*

Entre los 11 pacientes portadores de T/T para este SNP, tres fallecieron con injerto funcionando (dos a los 8 años y medio de iniciar el imTOR y otro a los 7 años), y se perdió el seguimiento de otro sujeto (a los 4 años) con injerto también funcionando.

Por otro lado, comparamos la supervivencia del riñón trasplantado entre los pacientes portadores y no portadores del alelo T en la posición +936. De nuevo no encontramos diferencias estadísticas ($p=0,73$) en los siguientes resultados:

- Portador de alelo +936T: 81,4% de riñones funcionantes al final del estudio; supervivencia media estimada de $161,9 \pm 7,1$ meses.

- No portadores de +936T: 81,3% de injertos funcionantes; supervivencia media estimada de $162,7 \pm 4,0$ meses.

5.10 Supervivencia del paciente

5.10.1 Causas de muerte del paciente trasplantado

Durante el estudio fallecieron en total 149 pacientes, un 25,6% de la muestra inicial (N=583), en una mediana de seguimiento de 76,5 meses (RIQ, 45,1-111,0).

Las causas de mortalidad se clasificaron en 4 grupos: patología tumoral maligna; evento cardiovascular; patología infecciosa y sepsis; y otras causas. El número y porcentaje de sujetos fallecidos por cada causa se detalla en la Tabla 20.

Tabla 20. Causas de éxitus letalis

Causa de muerte del paciente	N	% sobre el total	% sobre muertes
Patología oncológica	58	9,9%	38,9%
Evento cardiovascular	41	7,0%	27,5%
Infección / sepsis	35	6,0%	23,5%
Otras causas	15	2,6%	10,1%
TOTAL	149	25,6%	100%

5.10.2 Supervivencia del paciente según proteinuria

De la N de 551 casos que completó el estudio de proteinuria, se contabilizaron en total 129 pacientes fallecidos durante una mediana de seguimiento de 81,0 (48,5-112,4) meses.

Por tanto, la supervivencia de esta población al finalizar el estudio fue del 76,6%.

Si dividimos la población estudiada en función de si presentaron o no P800 obtuvimos los siguientes datos:

- Pacientes P800: 42 muertes de 110 casos (sobreviven el 72,4%), con una supervivencia media estimada (KM) de $130,7 \pm 7,5$ meses.
- Pacientes “no-P800”: 87 muertes de 312 casos (sobreviven el 78,2%), con una supervivencia media estimada (KM) de $157,3 \pm 3,8$ meses.

Al contrastar las funciones de supervivencia mediante la prueba de Mantel-Cox encontramos diferencias significativas ($p=0,001$), por lo que podemos concluir que la población que no desarrolló P800 presentó una supervivencia superior (**Figura 20**).

En el análisis de regresión de Cox, los pacientes P800 presentaron una tasa de incidencia de muerte cercana al doble: Hazard Ratio (HR) 1,86 (IC 95%: 1,3-2,7), $p=0,001$.

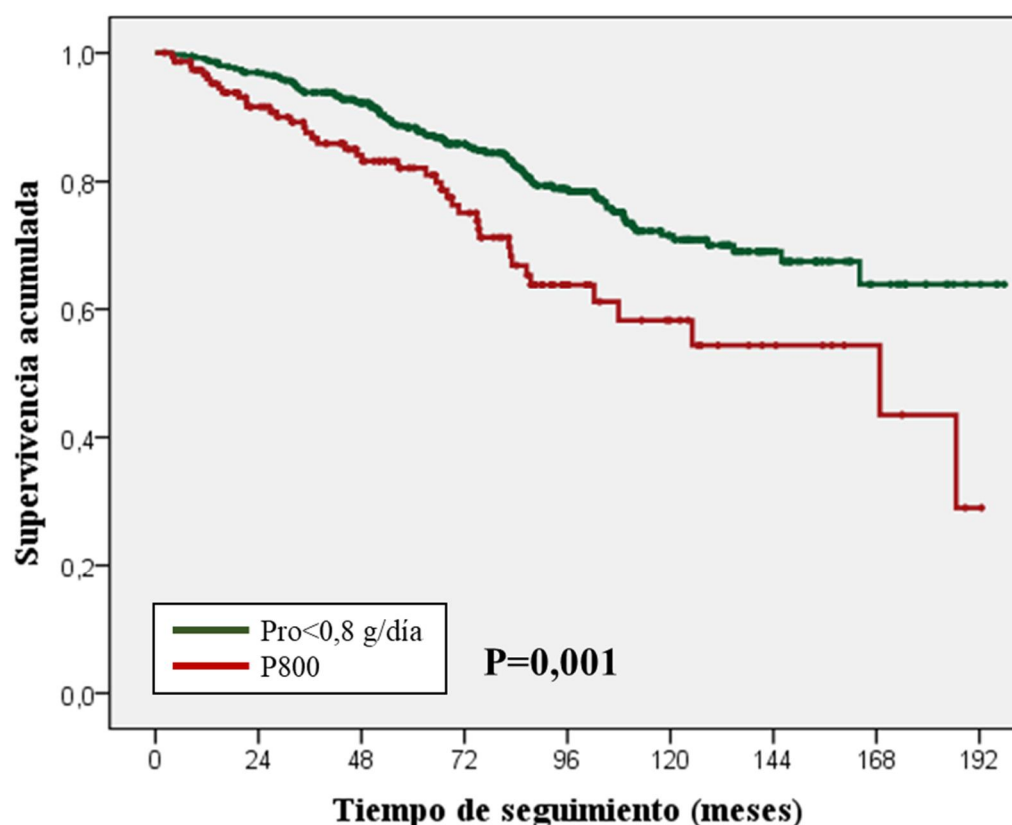


Figura 20. *Supervivencia del Paciente según Proteinuria.*

5.10.3 Supervivencia del paciente oncológico según proteinuria

Un porcentaje significativo de pacientes iniciaron tratamiento con imTOR debido a patología oncológica, que estuvo presente en un 42,1% de la población a estudio antes de la introducción del imTOR. La proteinuria es un factor de riesgo ya demostrado de mortalidad de origen cardiovascular. Dada la alta prevalencia de cáncer en nuestra población, decidimos analizar el impacto de la proteinuria, considerando P800, sobre la supervivencia del paciente oncológico.

Encontramos los siguientes resultados:

- Pacientes P800: 23 muertes de 47 casos (sobreviven el 51,1%), con una supervivencia media estimada (KM) de $91,8 \pm 11,4$ meses.
- Pacientes “no-P800”: 57 muertes de 171 casos (sobreviven el 66,7%), con una supervivencia media estimada (KM) de $139,8 \pm 5,9$ meses.

Al contrastar las funciones de supervivencia mediante la prueba de Mantel-Cox encontramos diferencias significativas ($p < 0,001$), por lo que la población oncológica que no desarrolló P800 presentó menor mortalidad (**Figura 21**).

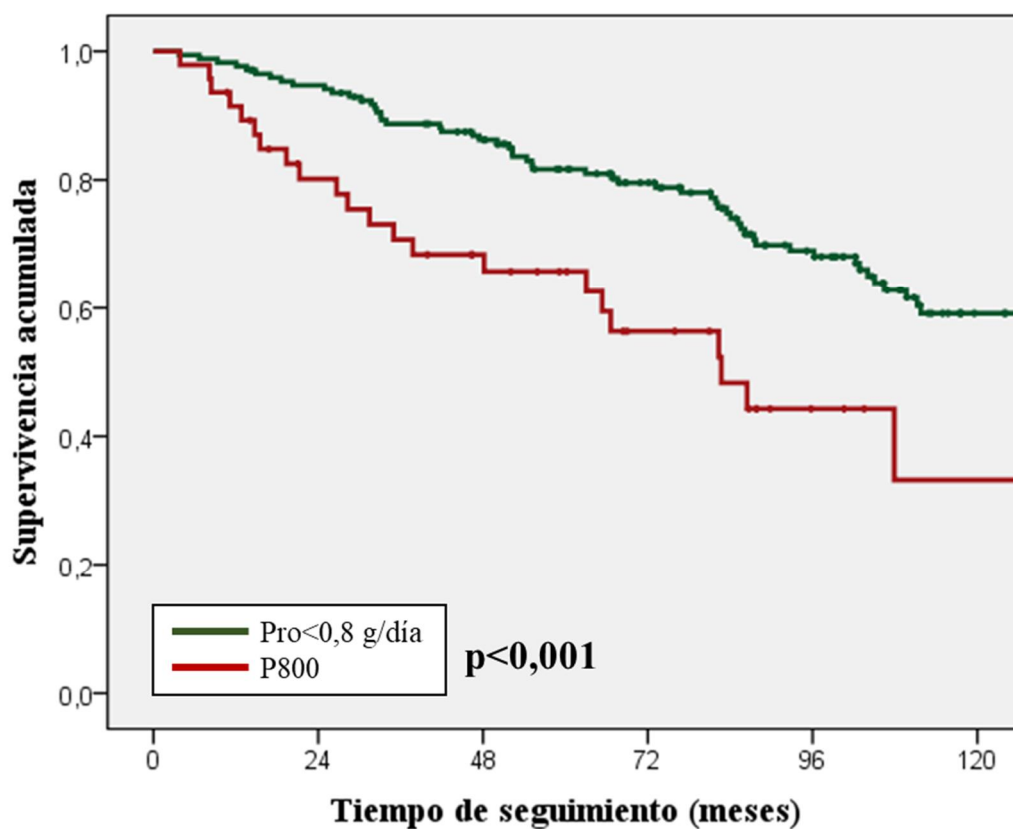


Figura 21. *Supervivencia del paciente oncológico según proteinuria.*

También analizamos la mortalidad por cáncer en función de la proteinuria incluyendo a todos los pacientes de la muestra. De nuevo, no desarrollar P800 se asoció a un menor riesgo de mortalidad por patología tumoral maligna ($p=0,001$, **Figura 22**):

- Pacientes P800: 20 muertes de 127 casos (sobreviven el 84,3%), con una supervivencia media estimada (KM) de $153,5 \pm 7,6$ meses.
- Pacientes “no-P800”: 28 muertes de 339 casos (sobreviven el 91,7%), con una supervivencia media estimada (KM) de $181,6 \pm 3,1$ meses.

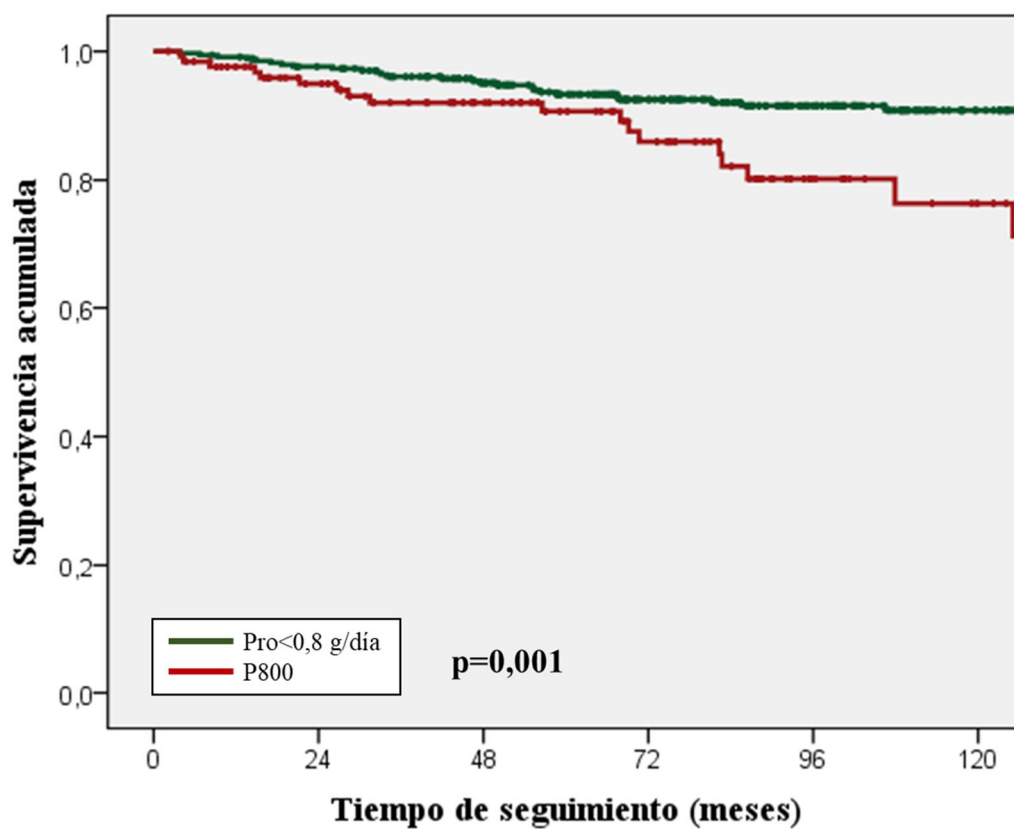


Figura 22. *Mortalidad por cáncer según proteinuria.*

5.10.4 Supervivencia del paciente según polimorfismos del VEGF

Analizamos si los SNPs del VEGF a estudio estaban relacionados con la supervivencia del paciente. Para ello comparamos las funciones de supervivencia de las combinaciones alélicas de cada polimorfismo y de la presencia o ausencia de cada alelo concreto.

SNP -1154G > A: Los pacientes homocigotos G/G presentaron mejores datos de supervivencia del paciente: media estimada de $161,9 \pm 4,8$ meses y un 80,5% de supervivencia al final del estudio, frente a $147,6 \pm 5,2$ meses y un 78,4% los heterocigotos G/A, y $147,2 \pm 11,0$ meses y un 70,5% los homocigotos A/A. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,44$) y la curva de supervivencia tendió a igualarse al final del seguimiento, especialmente entre los sujetos homocigotos G/G y A/A.

Los portadores del alelo -1154G tampoco mostraron una supervivencia superior a nivel estadístico: media estimada de $158,3 \pm 3,9$ meses (supervivencia final del 79,6%) vs. $147,2 \pm 11,0$ meses los no portadores de este alelo (supervivencia final del 70,5%), pero sin diferencias significativas ($p=0,26$).

SNP -2578C > A: Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia del paciente. Los homocigotos C/C presentaron mejores datos: media de supervivencia estimada de $163,9 \pm 5,5$ meses y supervivencia al finalizar el estudio del 82,6% (comparado con $154,0 \pm 5,2$ meses y 75,7% los heterocigotos A/C, y $155,1 \pm 7,9$ meses y 80,7% los homocigotos A/A), con $p=0,25$.

Portar el alelo -2578A supuso una menor supervivencia del paciente en nuestro estudio: media estimada de $154 \pm 4,5$ meses (vs. $163,9 \pm 5,5$ meses los no portadores) y porcentaje

de supervivientes del 77,2% (vs. 82,6% los no portadores), aunque de nuevo sin significación estadística ($p=0,148$, **Figura 23**).

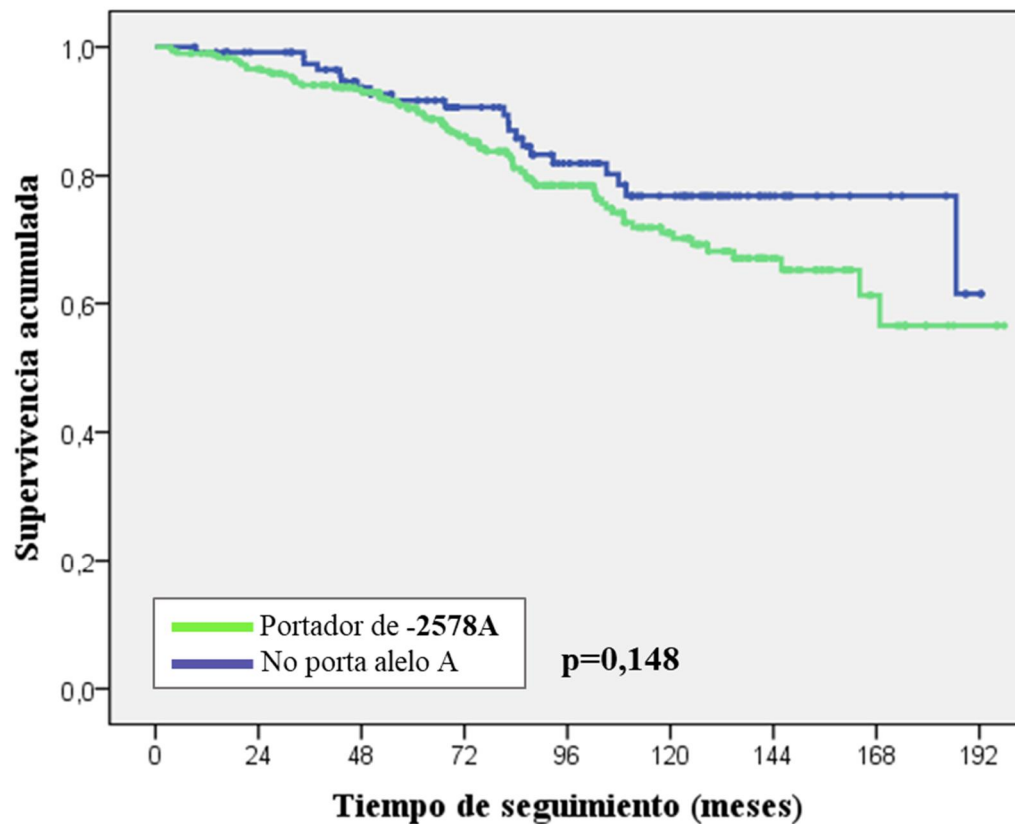


Figura 23. *Supervivencia del Paciente según alelo -2578A.*

SNP +936C > T: Obtuvimos los siguientes datos de supervivencia del receptor de trasplante renal, sin alcanzar la significación estadística ($p=0,17$):

- +936 C/C: media de $153,8 \pm 4,3$ meses y supervivencia final del 76,8%.
- +936 C/T: media de $168,1 \pm 6,0$ meses y supervivencia final del 85,7%.
- +936 T/T (N de 11): media de $149,9 \pm 19,7$ meses supervivencia final del 72,7%.

Contrastamos posteriormente las funciones de supervivencia de los portadores del alelo +936T frente a los no portadores. Encontramos una supervivencia del paciente superior entre los portadores de este alelo: media estimada de $168,4 \pm 6,1$ meses (vs. $153,8 \pm 4,3$ meses) y porcentaje de vivos al finalizar del 84,3% (vs. 76,8%). Estos datos de supervivencia a favor de los portadores del alelo T estuvieron cerca de ser estadísticamente significativos ($p=0,074$, **Figura 24**).

Por otro lado, en el análisis de regresión de Cox simple, los sujetos con genotipo C/C presentaron mayor riesgo de mortalidad: HR 1,74 (IC 95%: 0,96-3,14), respecto a los sujetos C/T, con una diferencia cercana a la significación estadística: $p=0,066$.

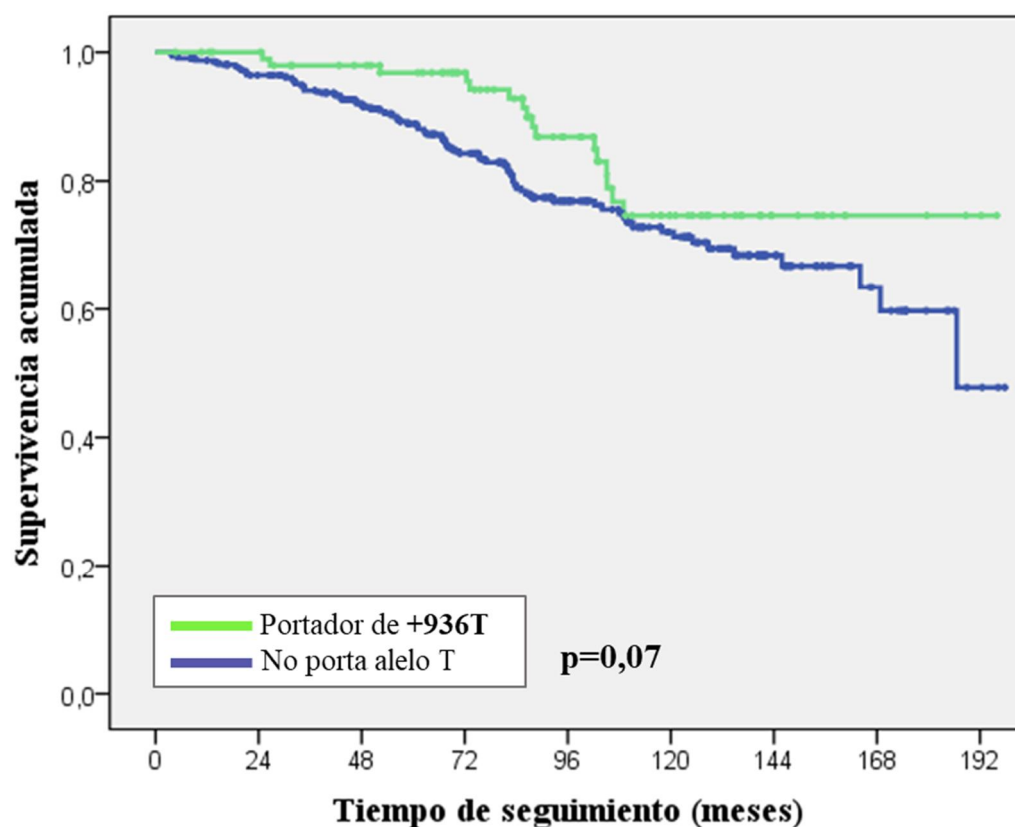


Figura 24. *Supervivencia del Paciente según alelo +936T.*

Dado que los pacientes heterocigotos C/T mostraron menor riesgo de proteinuria en el análisis multivariado, y que la proteinuria (P800) se comportó como un factor de riesgo de mortalidad por cáncer (considerando a todos los pacientes de la muestra), decidimos analizar ésta en función del SNP +936. Encontramos mejor supervivencia a favor de los sujetos C/T (**Figura 25**), aunque no significativa ($p=0,145$):

- +936 C/C: media de $175,7 \pm 4,0$ meses y supervivencia final del 89,6%.
- +936 C/T: media de $183,7 \pm 4,2$ meses y supervivencia final del 95,1%.

Si incluimos a los pacientes T/T, es decir , comparamos portadores del alelo +936T vs. no portadores, encontramos porcentajes y curvas de supervivencia muy similares, con $p=0,139$.

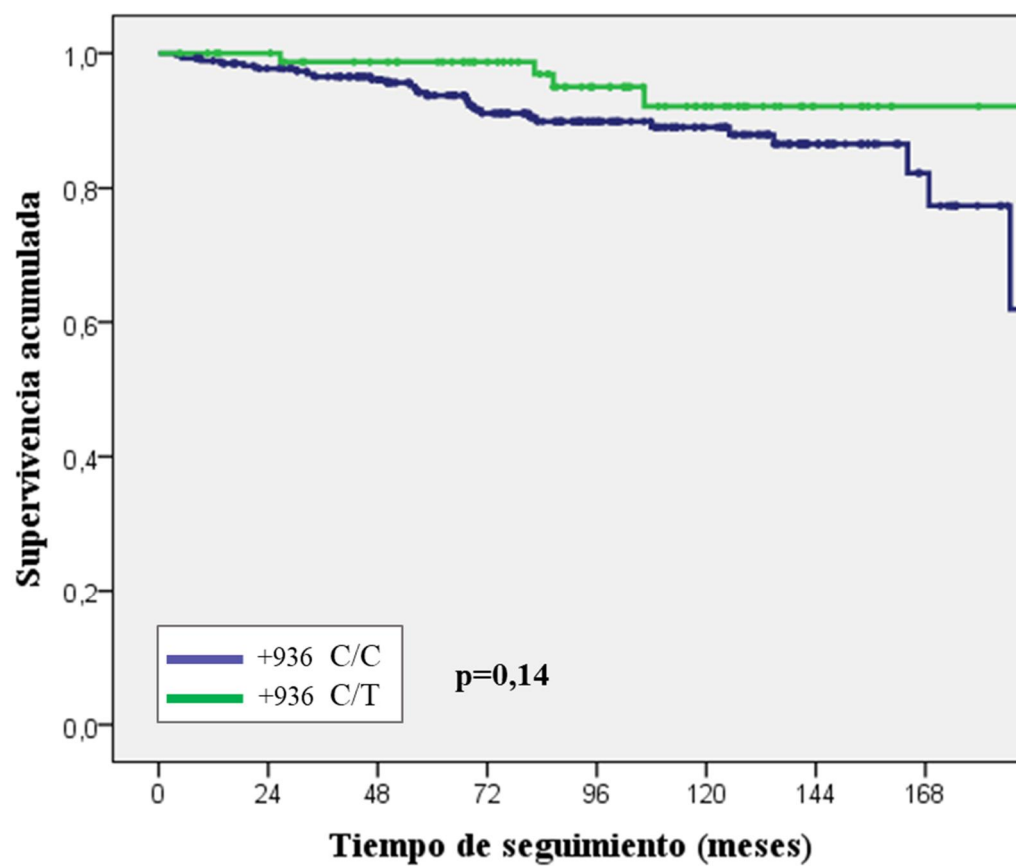
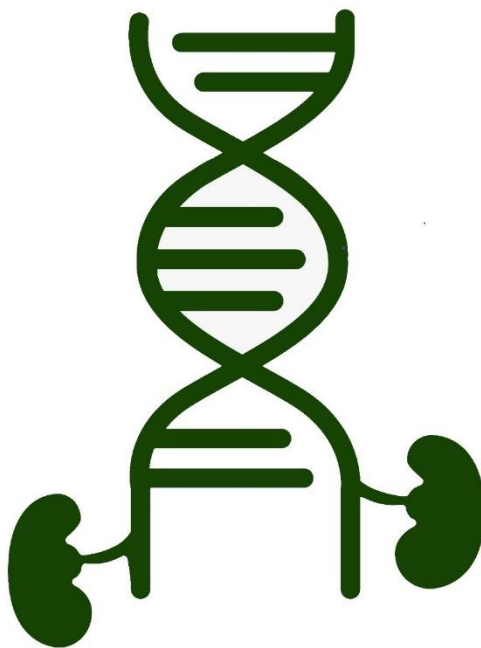


Figura 25. *Mortalidad por cáncer según +936 C>T.*

6. DISCUSIÓN



6 DISCUSIÓN

6.1 Consideraciones generales de los imTOR

Los inhibidores de la vía m-TOR (imTOR) fueron considerados, en sus inicios, como una alternativa potencialmente eficaz y no nefrotóxica²²⁸ a los inhibidores de la calcineurina (ICN) en el campo del trasplante renal (TxR). Actualmente su utilización está más cuestionada debido a su menor potencia inmunosupresora en comparación con los ICN, por lo que su uso está más ampliamente aceptado en combinación con éstos. En cualquier caso, los imTOR siguen teniendo un papel importante en muchos esquemas terapéuticos, gracias a sus propiedades anti-tumorales o su rol beneficioso en las infecciones víricas típicas del postrasplante (CMV, virus BK).

Los ensayos clínicos que han estudiado la conversión de estrategias inmunosupresoras basadas en los ICN a tratamiento de mantenimiento basado en un imTOR han mostrado cierta tendencia a una mejoría de la función renal del injerto a corto y medio plazo. Nuestra población ha mostrado un comportamiento similar al de otros grandes estudios, con una mejoría estadísticamente significativa de la tasa de filtración glomerular (TFG) al año de tratamiento con imTOR (46 mL/min basal y 47,3 mL/min un año después, $p=0,049$). Aunque en términos generales una diferencia de 1,3 mL/min de TFG es clínicamente irrelevante, hay que tener en consideración que la función renal del injerto sufre un declive gradual desde el trasplante. Esto fue estudiado en una cohorte de más de 40.000 TxR, en la que se objetivó un descenso medio de la TFG de $-1,66 \pm 6,5$ mL/min por año, en una mediana de seguimiento de 5,7 años²²⁹. Es reseñable que este declive

progresivo del filtrado glomerular es aún más marcado cuanto peor es la función renal de base^{230 231}. Teniendo en cuenta esto, hay que valorar que nuestra población no sólo no presentó el leve declive esperado de la TFG, sino que tuvo ligera tendencia a la mejoría o, cuanto menos, mantuvo estable la función renal. Por otra parte, en los ensayos clínicos realizados, los resultados óptimos relacionados con el tratamiento imTOR han sido más evidentes en pacientes de bajo riesgo inmunológico, y que además partían de tasas de filtrado glomerular (TFG) superiores y ausencia de proteinuria significativa. En nuestro estudio hubo un porcentaje importante de conversiones realizadas de forma tardía: la mediana de tiempo post-tx de inicio del imTOR fue de 50,8 meses (con rango intercuartílico: 13,8-121,9 meses). Además, el imTOR se introdujo en pacientes que en algunos casos presentaban cierto grado de proteinuria preexistente (el percentil 75 de la proteinuria basal fue de 521 mg/día). Estos dos factores pudieron justificar que no se haya evidenciado una mejoría aún más marcada de la TFG a corto plazo.

A pesar de las pequeñas mejorías del filtrado glomerular mostradas por algunos de los estudios de conversión^{95 98 99 100}, un aspecto importante a destacar son los problemas derivados del uso de los imTOR. En primer lugar, su menor potencia inmunosupresora se ha asociado a una mayor incidencia de ADEs y de RCMA, que pueden comprometer la supervivencia del injerto. Por otro lado, los imTOR presentan una tasa relativamente elevada de efectos secundarios que pueden obligar a la suspensión del tratamiento en al menos el 20-35% de los casos^{98 99 101 103 232}. En nuestro estudio se corrobora este dato: observamos un 35,2% de discontinuaciones del imTOR en una mediana de tiempo de exposición al fármaco de 51,2 meses (RIQ 17,1-92,1). Presentamos, por tanto, una tasa de suspensión del fármaco aparentemente superior a la descrita en otras investigaciones, aunque en nuestro caso se realizó un seguimiento prolongado, superior al de gran parte

de los estudios de conversión publicados. En los ensayos CONVERT¹⁰⁴, CONCEPT⁹⁵ y Spare The Nephron¹⁰⁵ se describieron tasas de discontinuación de entre el 16,8% y el 20%, pero contabilizando sólo un año de tratamiento. En el ensayo ZEUS¹⁰⁰, con un porcentaje de discontinuación durante el primer año similar (17,4%), el 40% de los pacientes convertidos tuvo que reiniciar el ICN en algún momento de los primeros 5 años de seguimiento. La mediana de tiempo de suspensión del imTOR, en nuestro caso, fue de 19,8 meses, con lo que un 17,6% de nuestra muestra suspendió el imTOR poco después del año y medio de tratamiento (habría que sumar, al menos, un 5,8% de suspensiones precoces no incluidas en este estudio). La tasa de discontinuación, por tanto, fue equiparable a la descrita en la literatura. Por otro lado, dentro del perfil de efectos adversos de los imTOR, se ha evidenciado en múltiples estudios aparición o incremento de proteinuria relacionada directamente con este tratamiento^{186 189 233}. Esto ha llevado a cuestionar la otrora característica carencia de nefrotoxicidad de los imTOR, y ha llevado también a la necesidad de investigar y comprender la fisiopatogenia de esta complicación, dada su importancia. En nuestro trabajo se confirma este aumento de proteinuria asociado a la utilización de fármacos imTOR, siendo el objetivo principal de nuestro estudio.

6.2 Diseño del estudio. Fortalezas y debilidades

Dada la relevancia clínica de la proteinuria en el riñón trasplantado, con repercusión demostrada sobre la supervivencia de injerto y paciente, diseñamos este trabajo para estudiar principalmente el VEGF como factor implicado en esta complicación.

Para ello, la intención primaria de esta Tesis Doctoral fue revisar la totalidad de conversiones o inicios de imTOR realizadas, hasta el año 2015, por parte de las dos

cohortes a estudio. Contabilizamos un total de 637, de las cuales 583 cumplieron los criterios de inclusión. De estos 583 pacientes, pudimos realizar el genotipado del gen del VEGF en 419, lo que supuso perder el 28% de los pacientes para el análisis multivariado. Aunque consideramos que un tamaño muestral de 419 pacientes es óptimo para nuestro estudio, no quisimos despreciar la información clínicamente relevante que nos pudo aportar la totalidad de pacientes tratados con imTOR (N=583); por ejemplo, en cuanto a suspensión del fármaco o en cuanto a supervivencia del injerto o del paciente en función de la proteinuria. En cualquier caso, implementamos un análisis de regresión logística multivariado sin incluir los genotipos del gen del VEGF para obtener la mayor N posible. La comparación de este análisis de regresión logística multivariable realizado con toda la población (N=583) vs. el realizado con la muestra con SNPs (N=419) mostró las mismas variables significativas, siendo además los coeficientes β y las odds ratio muy similares. Por tanto, creemos que la segunda muestra (N=419) es muy representativa de la primera, reforzando estos resultados la idea de que el tamaño muestral era adecuado para el estudio de los polimorfismos del VEGF.

En cuanto a los criterios de exclusión, consideramos obligatorio descartar a aquellos pacientes que no completaron un tratamiento con imTOR de al menos 3 meses. El objetivo principal es investigar un probable efecto directo del imTOR sobre el injerto, por lo que un tiempo corto de exposición al fármaco habría sido fútil para nuestro análisis. También realizamos el mismo estudio considerando sólo los sujetos que estuvieron bajo tratamiento con imTOR al menos 6 meses (descartando 34 casos de suspensión entre el tercer y el sexto mes). El análisis multivariado mantuvo las mismas variables significativas y presentó resultados muy similares (datos no mostrados). Otro criterio de exclusión fueron las suspensiones de tratamiento imTOR que se relacionaron

directamente con un episodio de rechazo. La proteinuria, variable objetivo principal de nuestro estudio, es un marcador inespecífico de daño renal. Nuestra hipótesis está basada en que el desarrollo de proteinuria post-imTOR se produce por un efecto del fármaco de tipo no inmunológico, por lo que la presencia de proteinuria asociada a un episodio de rechazo se habría comportado como un factor de confusión. En nuestro estudio contabilizamos 22 pérdidas de función del injerto secundarias a un rechazo crónico activo mediado por Ac (un 18,8% de las pérdidas de injerto y un 3,8% de la N total). Aunque este número pudo ser algo mayor dada la elevada cifra de pérdidas atribuidas a FIAT-I (algunas de ellas sin control histológico), la incidencia de ADEs post-imTOR no se relacionó con un mayor riesgo de P800, por lo que no incluimos esta variable en el análisis multivariado.

Por otra parte, las causas de conversión a imTOR (o de combinación con un ICN) estuvieron estrictamente definidas, de manera que los dos centros pudieron implementar homogéneamente la prescripción del imTOR. Tres de las causas más importantes fueron la patología tumoral maligna (42%), las infecciones víricas del post-tx (13%) y enfermedad cardiovascular severa (6,5%). Nuestro grupo tenía el convencimiento de que la indicación del imTOR formaba parte de la mejor estrategia terapéutica en estos pacientes. Por ese motivo, no hemos dispuesto de un grupo control de sujetos trasplantados renales de características similares, tratados con un ICN de mantenimiento y libres de imTOR. Ésta constituye la principal debilidad de este estudio, además de las limitaciones relacionadas con el carácter observacional del mismo, con recogida retrospectiva de los datos en parte de los casos estudiados. A pesar de la ausencia de grupo control, la supervivencia del injerto y del paciente en nuestra población (que podríamos considerar con una notable comorbilidad asociada) presentó datos comparables a los

descritos en otras series²³⁴, y el comportamiento en cuanto a la evolución de la proteinuria tras implementarse tratamiento con imTOR fue muy similar al descrito en otras investigaciones^{100 104 235}. Por otro lado, es importante destacar que, aunque las indicaciones de imTOR estuvieron protocolizadas, las conversiones fueron realizadas durante más de 15 años. En ese tiempo, la actividad y el conocimiento científico del manejo de la inmunosupresión fue experimentando notables avances; por ello, las indicaciones de conversión/combinación no han sido del todo homogéneas a lo largo de los años. Inicialmente, por ejemplo, consideramos la nefropatía crónica del injerto (NCI) como causa de conversión (lo fue en el 21% de los casos). Esta entidad englobó trasplantados que cursaban con un deterioro lento y progresivo de la función del injerto sin proteinuria importante. Muchos de ellos fueron biopsiados constatándose la NCI; pero en otros casos de evolución clínica análoga no se llegó a realizar la biopsia asumiéndose este diagnóstico. Tras la clasificación de Banff del año 2005, modificamos el ítem NCI como causa de indicación de imTOR sustituyéndolo por FIAT-i. Dada la ausencia de biopsia en algunos pacientes, además de las modificaciones en los criterios diagnósticos de ciertas entidades, no es descartable que algunos casos clasificados como FIAT-i presentaran realmente un rechazo crónico mediado por anticuerpos.

En cuanto a la fortaleza de este estudio, radicó principalmente en un número amplio de pacientes trasplantados renales incluidos, un tiempo de seguimiento prolongado (mediana de 76,5 [45,1-111,0] meses) y una indicación de conversión o introducción del imTOR protocolizada. Además, la recogida de datos clínicos y analíticos fue realizada de forma minuciosa y pormenorizada.

6.3 Importancia de la proteinuria post-imTOR

La proteinuria ha sido considerada clásicamente como marcador y expresión del daño renal. Tiene un carácter de marcador inespecífico, ya que se ha asociado a diversos procesos patológicos en el campo del trasplante renal: glomerulonefritis (recidivante o de novo), glomerulopatía del trasplante, rechazo crónico, nefrosclerosis, nefropatía por reflujo, etc^{236 237}. El grado de proteinuria, independientemente del proceso subyacente asociado o de la etiología (si existe) de la enfermedad glomerular, es el mayor factor predictivo de progresión al estadio terminal de la ERC junto al daño crónico a nivel túbulo-intersticial^{180 181 182}. De hecho, su presencia se ha asociado a una supervivencia menor del injerto, independientemente de la TFG y de los episodios de rechazo agudo presentados previamente¹⁸⁰. De igual modo, la proteinuria (incluso a baja cuantía) se ha asociado también a una supervivencia del paciente inferior¹⁸⁵. Este hallazgo se ha relacionado fundamentalmente con la morbilidad cardiovascular, por lo que la proteinuria podría comportarse también como un marcador de daño vascular extendido²³⁸.

La asociación del tratamiento imTOR con el desarrollo de proteinuria se ha descrito de forma constante en la literatura. La proteinuria ha constituido, de hecho, una causa importante de discontinuación de estos fármacos. En nuestro estudio fue, junto a la neumonitis, una de las dos principales causas de suspensión del imTOR, siendo responsable del 22% de las discontinuaciones (un 7,7% del total de pacientes tratados). Más importante aún es su papel como marcador: cuando la proteinuria aparece de forma significativa, suele asociar posteriormente deterioro progresivo de la función renal^{104 186}

²³⁹.

En nuestra investigación se ha evidenciado un incremento significativo de la proteinuria tras un año de tratamiento con imTOR (se realizó análisis por intención de tratar). Aunque no dispusimos de un brazo control para comparar la evolución de la proteinuria en pacientes libres de imTOR, sí contrastamos la proteinuria basal frente a datos previos (hasta 1 año pre-conversión). No encontramos modificaciones significativas de la misma entre la cifra de 1 año pre-imTOR y la basal. En cambio, un año después de iniciarse el tratamiento objetivamos un incremento de la excreción proteica urinaria de una mediana de 291,5 (151-521) mg/ 24h hasta 411,3 (237-801,5) mg/ 24h. Dadas las implicaciones de esta complicación descritas en la literatura^{104 109 185 240}, este aumento parece clínicamente relevante. En ese sentido, este trabajo mostró que el desarrollo de un grado importante de proteinuria se asoció a una supervivencia menor tanto del injerto como del propio paciente.

Para realizar el estudio, consideramos como punto de corte 800 mg/ 24h de proteinuria, equivalente al P₇₅ de la distribución global de la proteinuria al año post-imTOR. En un trabajo de Diekmann et al.²⁴¹, se describió que la excreción proteica urinaria superior a los 800 mg diarios fue el principal factor pronóstico de mala respuesta a la conversión de ICN a SRL. Se trataba de 59 pacientes con disfunción crónica del injerto (DCI), y la proteinuria <800 mg/ 24h se comportó como el único predictor independiente de buena respuesta. En el estudio retrospectivo realizado por nuestro grupo (Sánchez-Fructuoso, Ruiz et al.¹⁰⁹) en 220 trasplantados renales convertidos a EVL, también se objetivó un aumento significativo de la proteinuria al año post-conversión. Se describieron los siguientes factores de riesgo de desarrollar una excreción proteica urinaria ≥ 900 mg/ 24h: aclaramiento de creatinina inferior a 60 mL/min, hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL, no recibir tratamiento con prednisona, presencia de proteinuria basal ≥ 550 mg/ 24h y tiempo

post-tx de conversión superior a 3 años. Entre estos factores de riesgo, se encontró una interacción interesante entre la proteinuria preexistente y el momento post-tx de inicio del imTOR. Los pacientes con una excreción proteica superior a 550 mg/ 24h presentaron un riesgo diferente de desarrollar proteinuria ≥ 900 mg/ 24h al año en función de si la conversión fue realizada durante los 3 primeros años post-tx (29,8% de *proteinúricos*) o si fue más tardía (77,1% de *proteinúricos*, $p=0,02$). Por tanto, el momento post-tx en el que se realizó la conversión fue clave. Estos resultados se asociaron, además, a repercusión en la supervivencia del injerto renal: la proteinuria basal superior a 550 mg/ 24h fue factor de riesgo de pérdida del injerto sólo en las conversiones efectuadas tras el tercer año post-tx.

La proteinuria es, por tanto, un marcador de daño renal asociado también a malos resultados a medio plazo tras realizar conversión a imTOR¹⁰⁴. Esto puede ser más evidente cuando hay un daño histológico establecido en el riñón trasplantado, como se ha visto en estudios con injertos disfuncionantes²⁴² o en conversiones tardías. De hecho, se han descrito incluso desarrollos relativamente rápidos de síndrome nefrótico y deterioro progresivo de función renal tras conversiones realizadas en pacientes con DCI¹⁸⁶.

6.3.1 Influencia de la proteinuria en la supervivencia del injerto

En nuestro estudio, los sujetos que desarrollaron >800 mg/ 24h de proteinuria un año después de la introducción del imTOR (P800) presentaron una tasa superior de pérdida de injerto. Al finalizar una mediana de seguimiento total de 76,5 [45,1-111,0] meses, la supervivencia del riñón trasplantado (censurando muerte) en estos pacientes cayó hasta el 58%, comparado con un 89% en los que no presentaron P800 ($p<0,001$).

Además, el riesgo de perder la función del injerto fue más de 5 veces superior (HR de 5,5 [IC 95%: 3,7-8,0], $p<0,001$) en los pacientes proteinúricos. Estos hallazgos muestran claramente la importancia de la proteinuria como marcador, no sólo de conversión no exitosa de imTOR, sino de mal pronóstico de la función del riñón trasplantado. Otros trabajos han reportado resultados similares. Dos estudios describieron una supervivencia del injerto inferior en los pacientes que presentaron una Pro > 500 mg/ 24h de forma mantenida durante más de 6 meses: en uno de ellos la supervivencia de los TxR proteinúricos a 5 años fue del 69% vs. 93% los no proteinúricos ($p<0,001$)²⁴³; en otro fue del 58,6% vs. 80,4% respectivamente, $p=0,02$ ²⁴⁴.

La proteinuria, a pesar de asociarse inespecíficamente a entidades diversas (DCI, glomerulopatía del trasplante, glomerulonefritis de novo, rechazo agudo...²⁴⁵), se comporta sistemáticamente como marcador de peor supervivencia del injerto. En nuestro estudio, la proteinuria inducida tras tratamiento imTOR mantiene su rol como marcador de daño renal (independientemente de cuál sea su etiopatogenia u origen).

6.3.2 Influencia de la proteinuria en la supervivencia del paciente

El aumento de excreción proteica urinaria también ha tenido repercusión sobre la supervivencia del paciente en nuestra población.

La mortalidad global ha sido del 25,6% durante el seguimiento realizado (76,5 [45,1-111,0] meses). Hemos encontrado que la principal causa de muerte ha sido la patología tumoral maligna (38,9%), seguida de la patología cardiovascular (27,5%) y la patología infecciosa (23,5%). Estas tres son las principales causas de mortalidad, a nivel general, en el paciente trasplantado. Nuestra población está algo sesgada, dado que la patología oncológica fue una causa frecuente de indicación del imTOR, estando presente en el 42%

de los casos a estudio. Esto explicaría que el cáncer esté por delante de los eventos cardiovasculares como causa de mortalidad en nuestro estudio, a diferencia de lo reportado en otras investigaciones^{15 67 68}.

En cuanto a la proteinuria, los pacientes que desarrollaron P800 presentaron una supervivencia del 72,4%, frente a un 78,2% el resto de sujetos ($p=0,001$), en una mediana de seguimiento de 76,5 meses. La tasa de riesgo de muerte estuvo cerca de duplicarse en los pacientes proteinúricos: HR de 1,86 (IC 95%: 1,29-2,70), $p=0,001$. Estos resultados también son acordes con algunos reportes previos^{185 246 184}. En el estudio de Fernández-Fresnedo et al. (con una $N > 3.000$ pacientes), la proteinuria al año del TxR superior a 500 mg/ 24h se comportó como factor de riesgo independiente de mortalidad global y cardiovascular. Otro estudio retrospectivo en 616 receptores de TxR seguidos durante 62 meses mostró que la micro y macroalbuminuria fueron predictivos de muerte del paciente de forma independiente²⁴⁶. Roodnat et al. ($n=722$) también describieron un riesgo de mortalidad cercano al doble en los pacientes que presentaban proteinuria significativa al año del TxR¹⁸⁴. Estos resultados refuerzan la importancia de la proteinuria como marcador pronóstico en el trasplante renal.

6.4 Factores relacionados con la proteinuria post-imTOR en el análisis multivariado

No se conocen con claridad los mecanismos fisiopatogénicos por los que aparece o aumenta la proteinuria tras implementar terapia con un imTOR. Del mismo modo, se desconoce qué tipo de pacientes desarrollarán o no proteinuria con la introducción de este tratamiento. Parece necesaria, por tanto, la búsqueda e identificación de factores que

puedan predecir su aparición. Esto permitiría prever qué pacientes son susceptibles de presentar esta complicación e individualizar, más si cabe, la estrategia inmunosupresora.

En nuestra investigación, un 25% de los trasplantados renales estudiados desarrolló P800. Encontramos los siguientes factores de riesgo de proteinuria (P800) post-imTOR: TFG basal disminuida; mayor grado de proteinuria preexistente; hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia basales (pre-imTOR); menor edad del receptor; mayor tiempo post-tx de inicio del imTOR; tratamiento con bloqueo del SRA en el momento basal; y ser portador del genotipo +936 C/C (*wild type*) del gen del VEGF.

El genotipo +936 C/T, por tanto, se comportó como factor de protección para proteinuria post-imTOR, y no encontramos diferencias significativas con el genotipo T/T, en probable relación a su escasa presencia en la muestra (11 casos). No se mantuvieron en el modelo predictivo de proteinuria ni los genotipos del SNP -1154, ni la variable “toma de corticoides”, que sí había tenido relación estadística con P800 en el univariado.

6.4.1 Proteinuria basal como factor de riesgo

La existencia de excreción proteica urinaria previa es un factor de riesgo ya conocido de desarrollar un mayor grado de proteinuria post-imTOR^{104 110 235}. La presencia de proteínas en la orina se ha atribuido generalmente a una permeabilidad glomerular aumentada. En base a esto, se ha postulado que los cambios hemodinámicos relacionados con la suspensión del ICN (en contexto de conversión de ICN a imTOR) pueden contribuir al aumento de proteinuria¹⁹⁰. Éste se produciría por un incremento del flujo sanguíneo renal y de la presión intraglomerular al desaparecer el efecto del ICN, generando hiperfiltración y/o poniendo de manifiesto una alteración en la permeabilidad glomerular (en un injerto con daño preestablecido). En nuestro análisis se incluyeron un 85,4% de conversiones a

imTOR y un 14,6% de trasplantados con terapia combinada (ICN-imTOR). Los pacientes que mantuvieron el tratamiento ICN no mostraron un riesgo menor de P800 y tampoco presentaron una proteinuria media significativamente inferior al año de tratamiento. Por tanto, nuestro estudio sugiere que la proteinuria se produce en relación a un efecto específico del imTOR, independientemente de la retirada o no del ICN. En consonancia a esto, varios trabajos han mostrado el efecto proteinúrico del imTOR en contextos no relacionados con la suspensión de un ICN. Un ejemplo son los estudios de protocolos de inmunosupresión con imTOR de novo, que mostraron una incidencia de proteinuria claramente superior en el brazo de imTOR frente al de ICN^{193 194}. En otro reporte, Van den Akker et al. describieron incrementos significativos de la proteinuria (media de $0,37 \pm 0,34$ a $1,81 \pm 1,73$ g/ 24h, $p < 0,005$) en un estudio de conversión de azatioprina (o CsA) a SRL. De los 13 pacientes randomizados a conversión, presentaron incremento de proteinuria los 7 que ya la presentaban de base, y en 5 de ellos se trató de conversiones de azatioprina a SRL. Por otro lado, es interesante señalar que los 6 pacientes no proteinúricos pre-conversión continuaron siéndolo tras recibir SRL¹⁹².

6.4.2 Filtrado glomerular basal disminuido y riesgo de proteinuria

En nuestro estudio, los pacientes mostraron un riesgo promedio de P800 2,77 veces mayor si tenían una TFG basal de 35-50 mL/min, y cuadruplicaron el riesgo (OR 3,96 [IC 95%: 1,84-8,54], $p=0,002$) si partían de < 35 mL/min, en comparación con los sujetos que presentaban una TFG basal más conservada (>50 mL/min). Estos datos apoyan lo encontrado en otros trabajos y ensayos clínicos como el CONVERT¹⁰⁴. La presencia de proteinuria y de una TFG disminuida son indicativas de que existe un daño renal parenquimatoso preestablecido. Una explicación podría sustentarse en la menor potencia inmunosupresora de los imTOR, que acelerarían un daño ya originado de tipo

inmunológico o contribuirían al desarrollo de rechazo crónico activo mediado por anticuerpos. La retirada del ICN, de hecho, está asociada a un incremento del riesgo de rechazo agudo²⁴⁷. Sin embargo, la evidencia de proteinuria de novo en pacientes receptores de órgano sólido no renal tratados con imTOR²³⁹ apoya la necesidad de buscar efectos específicos (no inmunológicos) de estos fármacos en la génesis de la proteinuria. En cualquier caso, los injertos con DCI o daño crónico establecido parecen más susceptibles de sufrir esta complicación.

6.4.3 Hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia

Ambos son factores de riesgo de proteinuria post-imTOR ya descritos en la literatura¹⁰⁹¹⁹⁶. En nuestro estudio, los pacientes con hipertrigliceridemia (hiperTG, ≥ 150 mg/dL) o hipercolesterolemia basal (≥ 200 mg/dL) duplicaron el riesgo de desarrollar P800 (riesgo ligeramente mayor en el caso de la hiperTG, con OR 2,28 [IC 95%: 1,28 - 4,06], $p=0,004$). Cabría la posibilidad de que la proteinuria estuviese favorecida en un contexto de síndrome metabólico. En un estudio de Armstrong et al.²⁴⁸, en 90 pacientes trasplantados renales, el índice de masa corporal (IMC) elevado se comportó como un factor de riesgo independiente de progresión de proteinuria. La hiperTG está estrechamente relacionada con la obesidad, y ésta puede asociarse a hiperfiltración e incluso desarrollo de glomeruloesclerosis focal²⁴⁹. Sin embargo, aunque sólo disponíamos de datos de IMC de 370 pacientes, encontramos cierta asociación pero no una relación estadísticamente significativa entre TG e IMC (datos no mostrados).

Otra explicación se sustentaría en que la hiperlipidemia fuese reflejo de una situación de daño glomerular previo. Moorhead et al. hipotetizaron sobre la nefrotoxicidad lipídica, desencadenada tras una alteración glomerular inicial, como mediadora de la progresión

del daño renal²⁵⁰. En nuestro estudio no encontramos modificaciones de las cifras de proteinuria durante el año pre-imTOR, por lo que parece más plausible que sea la hiperlipidemia *per se* la que se comporte como factor de riesgo de enfermedad renal progresiva¹⁹⁷. En un estudio *in vitro* de células mesangiales expuestas a LDL-colesterol, éste provocó, a dosis bajas, un efecto mitógeno; en cambio, a dosis mayores la modificación oxidativa del LDL-colesterol medió efectos tóxicos sobre las células mesangiales²⁵¹. Otro reporte describió correlación entre la hiperTG (no así con la hipercolesterolemia) y el desarrollo de glomeruloesclerosis focal y segmentaria en ratas nefrectomizadas²⁵². Posteriormente, Nishida et al. describieron que lipoproteínas ricas en TG estimulaban la proliferación mesangial y la secreción de varias citoquinas que podrían estar implicadas en el daño sobre el glomérulo²⁵³.

Aunque los mecanismos fisiopatogénicos no se conocen con claridad, también se ha descrito en otros estudios la hiperTG como factor de riesgo de rechazo crónico del injerto²⁵⁴ y como predictor independiente de riesgo de proteinuria¹⁹⁷.

6.4.4 Tiempo post-trasplante de inicio del imTOR

El tiempo post-tx de inicio del tratamiento imTOR es otro factor de riesgo conocido, no sólo de proteinuria, sino de mala evolución de la función renal del injerto¹⁰⁹. Nuestros resultados han mostrado un ligero incremento del riesgo de proteinuria por cada año transcurrido desde el trasplante hasta el inicio del fármaco (OR 1,05 [IC 95%: 1,00-1,11], p=0,046). Este incremento del riesgo no ha sido tan marcado como el que se podía esperar en base a otros estudios^{104 109}, probablemente debido a que en nuestro caso hemos analizado un porcentaje muy elevado de conversiones tardías a imTOR, el cual fue introducido en una mediana de tiempo post-tx de aproximadamente 50 meses.

Una explicación del mayor riesgo de proteinuria en las conversiones tardías podría estar relacionada con el aumento de nefronas remanentes en hiperfiltración con el paso de los años. El riñón trasplantado, además de su condición de “único”, está sometido a diversos insultos inmunológicos y de otras clases (nefrotoxicidad, recidiva de la enfermedad basal, daño cardiovascular, reflujo...) que contribuyen a la pérdida progresiva de nefronas funcionantes. Cuando la pérdida nefronal es importante, los glomérulos sanos remanentes desarrollan un mecanismo compensador de hiperfiltración, que favorece la proteinuria. El efecto proteinúrico del fármaco imTOR sería, a su vez, más marcado en estos injertos. Por tanto, los beneficios que pueda aportar la introducción de un imTOR seguramente aparezcan con mayor frecuencia si el tiempo de conversión post-tx es menor.

6.4.5 Otras variables relacionadas con la proteinuria post-imTOR

La edad del paciente al momento de iniciar el imTOR se comportó como factor de protección de desarrollo de proteinuria (por cada año de edad, OR 0,973 [IC 95%: 0,952-0,995], $p=0,016$). Los receptores de trasplante renal más jóvenes presentan, a priori, un sistema inmunitario más competente y activo. Desde ese punto de vista, la introducción de un imTOR podría haber favorecido el desarrollo de RCMA en algunos de estos pacientes. Sin embargo, al contrastar por franjas de edad la presencia de ADEs (tanto pre como post-imTOR) no encontramos diferencias significativas. Sí las hubo, en cambio, al analizar la hiperTG por intervalos de edad (datos no mostrados). Los pacientes más jóvenes presentaron porcentajes superiores (especialmente la franja de 45-55 años, con un 41,6% de hiperTG) y los más añosos inferiores (21,1% en los mayores de 65 años), siendo estas diferencias significativas ($p=0,002$). Por lo explicado previamente, es posible que la mayor prevalencia de hiperTG en franjas de edad más jóvenes haya estado relacionada con un mayor riesgo de proteinuria.

Otro factor que se asoció en nuestro estudio a un riesgo mayor de P800 fue el empleo de fármacos bloqueantes del Sistema Renina Angiotensina (b-SRA) en el momento basal. Es lógico pensar que la mayoría de pacientes que partían previamente de un grado de proteinuria más relevante recibiesen tratamiento con este tipo de fármacos, por lo que este resultado se trataría muy probablemente de una falacia de causalidad inversa (los más proteinúricos fueron los más tratados con b-SRA). El diseño del estudio no permite valorar adecuadamente si el efecto antiproteinúrico de los b-SRA disminuye la excreción proteica urinaria inducida por los imTOR. Sin embargo, al analizar *a posteriori* los sujetos que iniciaron la toma de un b-SRA **después** de la conversión (n=68), encontramos que estos pacientes presentaron un ratio “proteinuria al año/proteinuria basal” significativamente inferior que el resto (n=454): $1,76 \pm 1,35$ vs. $9,18 \pm 62,13$ respectivamente, $p=0,011$. Este resultado apoya la tesis de que el uso de bloqueantes del SRA puede frenar en cierta medida la proteinuria post-imTOR.

6.4.6 Genotipo +936 C/T

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue analizar si alguno de los SNP del VEGF a estudio tuvo relación con la proteinuria post-imTOR. En el análisis multivariado encontramos que los **portadores del genotipo C/T en el SNP +936**, teóricamente bajos productores de VEGF, presentaron un **menor riesgo de desarrollar P800** estadísticamente significativo: OR 0,42 (IC 95%: 0,20-0,88), $p=0,022$.

Dicho de otro modo, los pacientes **portadores del genotipo *wild type* (+936 C/C)** presentaron un **riesgo promedio de proteinuria superior al doble**: OR 2,36 (IC 95%: 1,13-4,93).

En nuestra muestra sólo contamos con 11 pacientes con el genotipo mutado +936 T/T, ya descrito como el menos frecuente en la literatura^{220 255 256}. No observamos diferencias significativas en el análisis multivariado, debido en gran medida al escaso número de portadores de este genotipo. En cualquier caso, incluimos también análisis de supervivencia de injerto y paciente contrastando los sujetos C/C vs. C/T y desestimando los T/T debido a su baja N.

6.5 Rol del VEGF y de sus polimorfismos en la proteinuria post-imTOR

El VEGF es una proteína pleiotrópica compleja implicada en la angiogénesis, la supervivencia de la célula endotelial y la permeabilidad vascular, entre otras funciones. También se encarga de controlar la supervivencia de las células madre hematopoyéticas, fundamentales para la angiogénesis de mantenimiento^{257 258}. A nivel renal tiene un rol importante en la preservación y reparación de las células del endotelio glomerular y de los capilares peritubulares. De hecho, en modelos experimentales de enfermedad renal progresiva, el desarrollo de glomeruloesclerosis y AT se ha correlacionado con la pérdida de capilares peritubulares y una expresión disminuida del VEGF²⁰⁸.

6.5.1 Rol del VEGF en la proteinuria post-imTOR

En la literatura se han descrito diversos mecanismos fisiopatológicos como posible explicación de la proteinuria post-imTOR. Straathof-Galema reportó un caso de proteinuria severa en un receptor de TxR tratado de novo con SRL. A nivel histológico se objetivó una marcada disminución de albúmina en el epitelio tubular proximal, sugerente de una interferencia del SRL con la endocitosis proteica¹⁹⁹. Un estudio *in vitro*

posterior, sin embargo, no evidenció reducción de la endocitosis de albúmina en células del túbulo proximal expuestas a concentraciones de SRL de hasta 25 ng/mL²⁵⁹. En otro trabajo de Coombes et al. se estudió el efecto del SRL en un modelo de nefropatía inducida por sobrecarga proteica. Se produjo una formación excesiva de cilindros intratubulares, probablemente por interferencia del imTOR con los mecanismos compensadores del túbulo ante una glomerulopatía nefrótica, con afectación de la endocitosis proteica y la proliferación tubular²⁶⁰. Otros autores rechazan la patogenia tubular sugiriendo un origen glomerular de la proteinuria post- imTOR^{261 262 263}. Letavernier et al. describió lesiones tipo glomeruloesclerosis focal y segmentaria en ocho TxR tratados con SRL²⁶⁴. En la inmunohistoquímica, algunos podocitos presentaron pérdida de sinaptopodina (proteína del aparato contráctil de los procesos pediculados) y adoptaron un patrón fenotípico fetal. Se observó un descenso de la expresión podocitaria del VEGF, que pudo ser inducido por SRL o secundario a la dediferenciación del podocito. Los pacientes que recibieron SRL de novo presentaron niveles en sangre elevados, pero otros pacientes expuestos a niveles similares no mostraron estos hallazgos clínico-histológicos. En un estudio *in vitro* posterior, con exposición de podocitos a concentraciones terapéuticas de SRL²⁶⁵, se observó disminución de la síntesis de VEGF, de la fosforilación de Akt (cascada de señalización intracelular mediada por la PI3K) y de la expresión de WT1, factor de transcripción esencial para mantener la integridad del podocito.

Los imTOR, por tanto, reducen la síntesis, secreción y señalización del VEGF mediada por VEGFR-2⁸¹. Esta interferencia en la actividad del VEGF y la vía PI3K/Akt/mTOR, que puede comprometer los mecanismos de autofagia^{266 267} (del podocito y de la célula

endotelial) y provocar daño podocitario, es considerada actualmente como el principal mecanismo de proteinuria secundaria a imTOR²⁶⁸ (**Figura 26**).

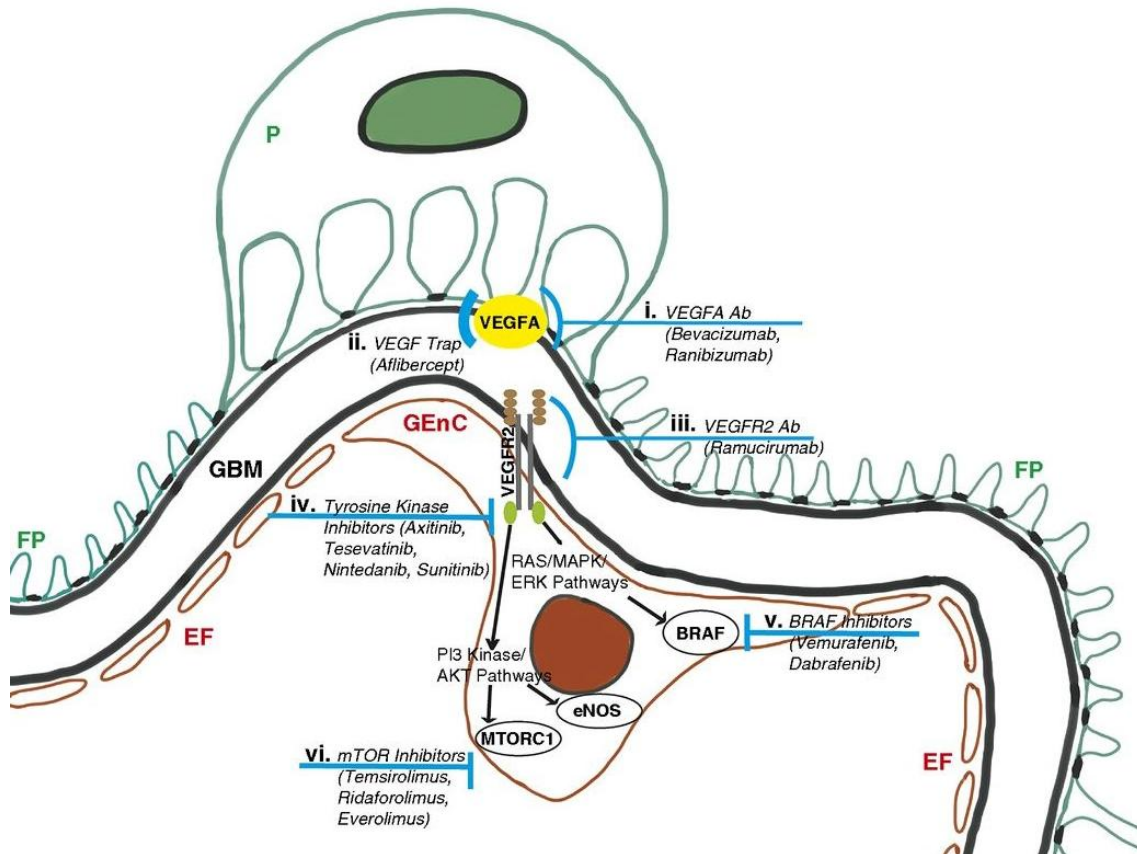


Figura 26. Fármacos y vías de inhibición de la actividad del VEGF (Estrada et al.²⁶⁸). Ab: anticuerpo. EF: fenestración endotelial. FP: *foot process* (proceso podocitario). GMB: membrana basal glomerular. GenC: célula endotelial glomerular. P: podocito.

6.5.2 Rol de los polimorfismos del VEGF

En nuestro estudio encontramos que los pacientes portadores del genotipo C/T en el SNP +936 del VEGF (posiblemente podríamos hablar de portadores del alelo T) presentaron menos riesgo de desarrollar proteinuria post-imTOR que los sujetos CC (*wild type*). Esta mutación producida en el polimorfismo +936, con cambio de Citosina por Timina, se ha

correlacionado con niveles inferiores del VEGF en sangre^{217 255}. Es llamativo, entonces, que un bajo productor de VEGF que recibe imTOR (el cual contribuye a una menor actividad, si cabe, del VEGF) sea un tipo de paciente con menor riesgo de proteinuria. Una explicación a este hallazgo podría estar en consonancia con el estudio del SNP +936 C>T publicado por Günesacar et al.²²⁰. En dicho estudio se genotiparon 555 receptores de TxR (además de 187 sujetos controles sanos) y se compararon los resultados entre 290 pacientes con criterios de buena función renal del injerto (creatinina <130 µmol/L y ausencia de episodios de rechazo durante el primer año post-tx) frente a 265 trasplantados con fallo renal del injerto. Se observó un porcentaje superior de portadores del alelo +936T entre los pacientes con resultados óptimos del TxR frente a los que presentaban peor evolución: 20,7% vs. 12,8%, respectivamente, p=0,017. Estos hallazgos se interpretaron como un menor riesgo de rechazo asociado a los sujetos portadores del alelo T, que presumiblemente asociarían a su vez una menor producción de VEGF. Algunos autores han sugerido que el VEGF se comporta como una citoquina proinflamatoria durante los episodios de rechazo agudo, favoreciendo el reclutamiento de monocitos y células T, e incluso iniciando la cascada inflamatoria²⁶⁹. En la misma línea, en un estudio *in vitro* se evidenció que los linfocitos T activados (por Ag o por IL-2) pueden secretar VEGF, y que éste, además, contribuye a la diferenciación proinflamatoria de estas células²⁷⁰. La presencia del alelo +936T, asociada a una menor expresión del VEGF, disminuiría el reclutamiento y la unión a moléculas de adhesión endoteliales de linfocitos T y otras células inflamatorias, pudiendo reducir la severidad y/o la incidencia de rechazo. En nuestro estudio, sin embargo, el mayor riesgo de proteinuria de los homocigotos +936 C/C no se correlacionó con peores datos de supervivencia del injerto. Los pacientes portadores de los genotipos C/C y C/T presentaron porcentajes de riñones funcionantes y

curvas de supervivencia muy similares, probablemente debido a que las pérdidas de injerto dependieron de múltiples factores, y algunos de ellos no han formado parte del objetivo principal de esta investigación. Tampoco encontramos asociación entre los portadores del genotipo +936 C/C y las pérdidas de injerto por rechazo (agudo o crónico) o la presencia de ADEs (incidencia de ADEs post-imTOR: C/C 10%, C/T 8,8%, p=NS). Por otro lado, aunque una de las limitaciones de nuestro trabajo es la ausencia de determinación de niveles de VEGF en sangre en nuestra población, parece demostrada la menor expresión de este factor en sujetos portadores del alelo +936T^{220 255 256}. El VEGF, como ya se ha expuesto, es clave para mantener la integridad de las células podocitarias y endoteliales en el glomérulo. Asumiendo que los sujetos con alelo T (heterocigotos C/T en nuestro estudio) son bajos productores de VEGF, una justificación de nuestros resultados radicaría en que estos pacientes serían capaces (basalmente) de activar vías alternativas de estimulación de podocitos y células endoteliales. El imTOR no tendría acción sobre estas supuestas vías alternativas, por lo que se minimizaría su efecto deletéreo en el glomérulo. Otra explicación diferente podría estar relacionada con el efecto post-receptor del VEGF. La acción del VEGF, de hecho, está en parte determinada por el tipo de receptor que media la señal²¹⁹. El VEGFR-2 interviene en la mayoría de señales pro-supervivencia de la célula endotelial; el VEGFR-1, en cambio, se encarga de estimular la migración leucocitaria y puede regular negativamente la expresión de VEGFR-2²⁷¹. Cabría la posibilidad de que ciertos SNP del gen del VEGF (en este caso el localizado en +936) condicionaran una respuesta post-receptor diferente, de tal manera que la interferencia del imTOR sobre la vía de señalización Akt-PI3K fuese menor, y que esta respuesta post-receptor diferente fuese independiente de la reducción de los niveles séricos del VEGF.

SNP y supervivencia del injerto.

Encontramos que los portadores del alelo -1154G tendieron a presentar peor supervivencia del injerto, sin llegar a la significación estadística ($p=0,084$), frente a una mejor supervivencia renal de los pacientes con genotipo -1154 AA. Este polimorfismo y el -2578 C>A se han relacionado también con cambios en la expresión proteica del VEGF: en un análisis de células mononucleares activadas de sangre periférica, en voluntarios sanos, se encontró que los genotipos -1154 A/A y -2578 A/A se correlacionaban con una producción disminuida²¹⁸. En nuestro caso, al analizar los portadores del alelo -1154G encontramos una mayor presencia de ADEs detectados tras la introducción del imTOR vs. los no portadores de este alelo: 11% vs. 2,3% respectivamente, con diferencias significativas en este caso ($p=0,048$). La mayor presencia de ADEs, y probablemente de RCMA, explicaría la peor supervivencia encontrada en nuestro estudio. En este caso, la mayor producción de VEGF de los pacientes portadores del alelo -1154G, en un contexto de menor intensidad inmunosupresora al realizar conversión a imTOR, podría haber jugado un papel favoreciendo el riesgo de rechazo. En esa línea, el trabajo de Shahbazi et al.²¹⁸ puso de manifiesto que trasplantados renales con alta producción del VEGF, asociada a portar los alelos -1154G y -2578C (ambos ligados en nuestro estudio), presentaban mayor riesgo de rechazo agudo los 3 primeros meses post-tx comparados con los pacientes homocigotos A/A para ambos SNP. En estos casos, el VEGF pareció jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria aguda post-tx, en un contexto, además, de elevada tasa de rechazo agudo (38%).

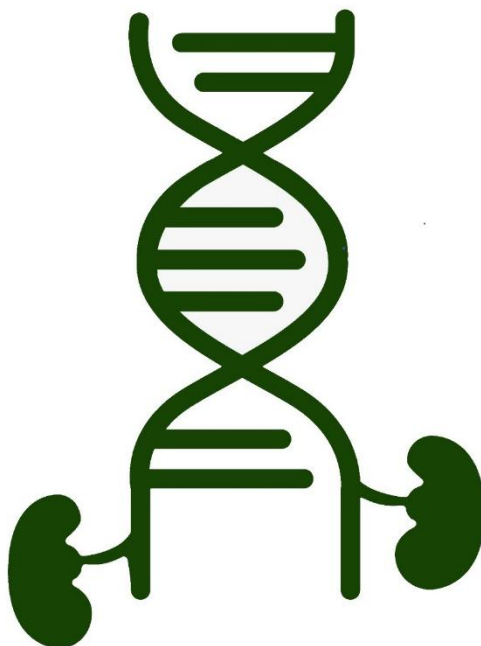
Es llamativo que los resultados publicados sobre los SNP del VEGF y su influencia en la función y supervivencia del injerto no muestran del todo concordancia y homogeneidad. Esto puede estar relacionado con el rol que adopta el VEGF en función del contexto clínico. Un factor importante a tener en cuenta podría ser el riesgo inmunológico del paciente trasplantado, e incluso el momento post-trasplante. Por ejemplo, podríamos especular que una alta producción de VEGF se relacionaría con una mejor supervivencia del injerto ante insultos renales de tipo cardiovascular; en cambio, ante un episodio de rechazo desencadenado, el VEGF podría ser un potenciador importante del daño tisular.

Supervivencia del paciente.

No encontramos resultados concluyentes, aunque sí observamos ligera tendencia a más supervivencia de los sujetos con genotipo -2578 C/C (en cierta medida, también los portadores de -1154 G/G por desequilibrio de ligamiento), frente a peor supervivencia de los portadores del alelo -2578A (sin significación estadística, $p=0,148$). En la investigación de Lemos et al.²¹³ se encontró relación entre estos dos polimorfismos y la supervivencia del injerto. En dicho estudio analizaron también los SNP de los donantes sin encontrar relación con los resultados del TxR. Esto sugirió que la producción del VEGF por parte del receptor puede ser clave para la reparación tisular, en especial del endotelio, tras una complicación vascular o un daño de necrosis tubular aguda. Los pacientes con una producción elevada del VEGF, en concreto los portadores del alelo -2578C, presentaron mayor supervivencia del injerto y no mostraron más riesgo de rechazo agudo. Aunque los pacientes -2578 C/C de nuestra población tendieron a presentar menos mortalidad, no encontramos relación entre este genotipo y otros aspectos analizados (proteinuria, supervivencia del injerto, ADEs, etc).

En cuanto al polimorfismo +936, sí encontramos datos de mejor supervivencia del paciente en los portadores del **alelo+936T**, aunque no llegó a la significación estadística ($p=0,074$): 23,2% de muertes los C/C vs. 15,7% los portadores de +936T, y estimación por KM de $153,9\pm 4$ meses los C/C vs. $168,4\pm 6$ meses los sujetos con alelo T. Además, en el análisis de regresión de Cox simple el genotipo C/C tuvo un riesgo de mortalidad mayor: HR 1,74 (IC 95%: 0,96-3,14) con respecto al genotipo C/T, de nuevo cercano a la significación: $p=0,066$. Es probable que la menor incidencia de proteinuria en los sujetos C/T haya contribuido a esta tendencia desfavorable para los homocigotos C/C, aunque no podemos ser concluyentes con estos resultados. Por otro lado, dado que se ha descrito en un estudio mejores datos de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal portadores del alelo+936T²⁷², contrastamos la supervivencia por muerte tumoral. Encontramos también tendencia a datos favorables a C/T (CC: 10,4% de eventos vs. CT: 4,9%), pero no significativos ($p=0,14$). En cualquier caso, dada la utilidad del imTOR en el paciente oncológico, los polimorfismos del gen del VEGF podrían ser un campo de investigación especialmente interesante en estos pacientes.

7. CONCLUSIONES



7 CONCLUSIONES

1.- El genotipo C/T del SNP +936 del gen del VEGF y ser portador del alelo +936T puede estar asociado a un menor riesgo de proteinuria en el paciente trasplantado renal tratado con inhibidores de la vía m-TOR.

2.- La introducción de un fármaco imTOR, ya sea en conversión o como combinación con un inhibidor de la calcineurina, está relacionada con un aumento significativo de la proteinuria al año en el paciente trasplantado.

3.- El desarrollo de un grado elevado de proteinuria al año post-tratamiento con imTOR está relacionado con una peor supervivencia del injerto renal.

4.- El desarrollo de un grado elevado de proteinuria al año post-tratamiento con imTOR está relacionado con una peor supervivencia del paciente trasplantado renal.

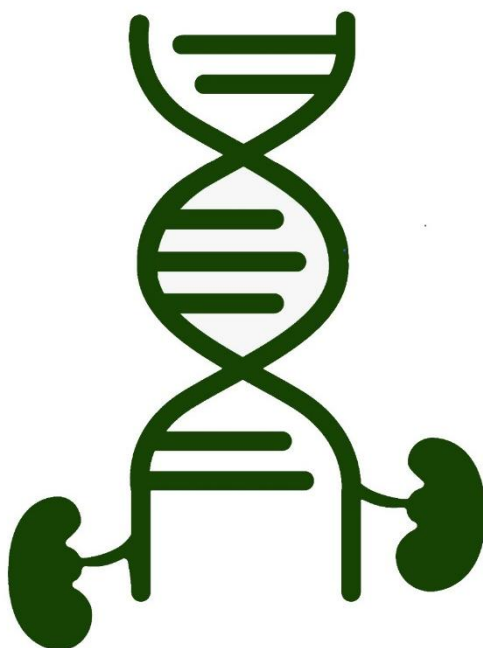
5.- Factores ya conocidos como una función renal basal deteriorada, proteinuria preexistente, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y un mayor tiempo post-trasplante de inicio del imTOR se han asociado a un riesgo mayor de proteinuria post-imTOR.

6.- La edad del paciente trasplantado ha tenido influencia en el desarrollo de proteinuria post-imTOR, con un riesgo más elevado en los pacientes más jóvenes.

7.- Los alelos -1154G y -2578C, así como -1154A y -2578A, han mostrado desequilibrio de ligamiento.

8.- No hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los SNP del gen del VEGF estudiados (-1154 G>A, -2578 C>A y +936 C>T) y la supervivencia de injerto y paciente. Tampoco encontramos relación entre los SNP -1154 G>A y -2578 C>A y la proteinuria.

8. BIBLIOGRAFÍA



8 BIBLIOGRAFÍA

1. Agüera Fernández LG, Robles JE, Rosell D, Rodríguez-Rubio FI, Abad JI, Zudaire JJ, et al. Multivariate analysis of graft survival prognostic factors in renal transplantation. Arch Esp Urol. 1995 Jun;48(5):497–505.
2. Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation - A history of converging timelines. Vol. 25, Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. J Biol Regul Homeost Agents; 2011. p. 493–504.
3. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Benedict Cosimi A. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. Vol. 346, New England Journal of Medicine. N Engl J Med; 2002. p. 580–90.
4. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. Vol. 351, New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society ; 2004. p. 2715–29.
5. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):605–12.
6. Young BY, Gill J, Huang E, Takemoto SK, Anastasi B, Shah T, et al. Living donor kidney versus simultaneous pancreas-kidney transplant in type I diabetics: An analysis of the OPTN/UNOS database. Clin J Am Soc Nephrol. 2009 May 1;4(4):845–52.
7. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival

- improvement in the United States: The long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am J Transplant*. 2011 Jun;11(6):1226–35.
8. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of Survival Probabilities for Dialysis Patients vs Cadaveric Renal Transplant Recipients. *JAMA J Am Med Assoc*. 1993 Sep 15;270(11):1339–43.
 9. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. Vol. 331, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society ; 1994. p. 365–76.
 10. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of Improvement in Renal Allograft Survival Despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates over the Most Recent Era. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):378–83.
 11. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: Have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant*. 2004 Aug;4(8):1289–95.
 12. Rodrigo E, Miñambres E, Ruiz JC, Ballesteros A, Piñera C, Quintanar J, et al. Prediction of delayed graft function by means of a novel web-based calculator: A single-center experience. *Am J Transplant*. 2012 Jan;12(1):240–4.
 13. Hernández D, Sánchez-Fructuoso A, González-Posada JM, Arias M, Campistol JM, Rufino M, et al. A novel risk score for mortality in renal transplant recipients beyond the first posttransplant year. *Transplantation*. 2009;88(6):803–9.
 14. Kreis HA. Causes of late renal allograft loss: Chronic allograft dysfunction, death, and other factors. In: *Transplantation*. Transplantation; 2001.
 15. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term

- survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int.* 2000;57(1):307–13.
16. Silkensen JR. Long-term complications in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(3):582–8.
 17. Shrestha B, Haylor J. Evolution of the concept and pathogenesis of chronic renal allograft injury: An updated review. Vol. 14, *Experimental and Clinical Transplantation*. Baskent University; 2016. p. 596–605.
 18. Pascual J, Alonso A, Burgos D, Cruzado JM, Serón D, Grupo Español de Consenso sobre disfuncion renal cronica en pacientes. Chronic renal dysfunction in kidney transplant recipients. Consensus Document. Spanish Consensus Group on Renal Dysfunction in Kidney Transplantation Patients. In: *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrologia*. Nefrologia; 2012. p. 1–28.
 19. Cornell LD, Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. Vol. 14, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 229–34.
 20. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest.* 1955;34(2):327–82.
 21. Porter KA, Owen K, Mowbray JF, Thomson WB, Kenyon JR, Peart WS. Obliterative Vascular Changes in Four Human Kidney Homotransplants. *Br Med J.* 1963 Sep 14;2(5358):639–47.
 22. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral Antibodies in

- Renal Allotransplantation in Man. *N Engl J Med*. 1970 Jan 15;282(3):111–7.
23. Halloran PF. Call for revolution: A new approach to describing allograft deterioration. Vol. 2, *American Journal of Transplantation*. *Am J Transplant*; 2002. p. 195–200.
 24. Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int*. 1999;56(3):783–93.
 25. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411–22.
 26. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: The concept of accelerated senescence. Vol. 10, *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999. p. 167–81.
 27. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). In: *American Journal of Transplantation*. *Am J Transplant*; 2007. p. 518–26.
 28. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9:S1–155.
 29. Haynes R, Blackwell L, Staplin N, Herrington WG, Emberson J, Judge PK, et al. Campath, calcineurin inhibitor reduction, and chronic allograft nephropathy (the 3C Study) – results of a randomized controlled clinical trial. *Am J Transplant*. 2018

Jun 1;18(6):1424–34.

30. Tang H, Xu Y, Zhang Z, Zeng S, Dong W, Jiao W, et al. SDF-1/CXCR4 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in rat chronic allograft nephropathy. *Mol Med Rep.* 2019 May 1;49(5):3696–706.
31. Maryniak RK, First MR, Weiss MA. Transplant glomerulopathy: Evolution of morphologically distinct changes. *Kidney Int.* 1985;27(5):799–806.
32. Weir MR, Wali RK. Minimizing the risk of chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2009;87(8 Suppl).
33. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: A report of the FK506 kidney transplant study group. *Transplantation.* 1998 Dec 27;66(12):1736–40.
34. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349(24):2326–33.
35. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb 18;4(2):481–508.
36. Bennett WM. The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs. *Ren Fail.* 1998 Sep;20(5):687–90.
37. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care.* 2001

- Dec;7(6):384–9.
38. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic Allograft Nephropathy: Current Concepts and Future Directions. *Transplantation*. 2006 Mar;81(5):643–54.
 39. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int*. 1985 Nov;28(5):767–74.
 40. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, et al. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1359–68.
 41. Ichihara A, Imig JD, Navar LG. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):843–7.
 42. Komers R, Anderson S, Epstein M. Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am J Kidney Dis*. 2001 Dec;38(6):1145–57.
 43. Rouillet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest*. 1994 May 1;93(5):2244–50.
 44. Vieira JM, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation*. 1999 Dec 15;68(11):1746–53.
 45. Campistol JM, Sacks SH. Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation*. 2000 Jun 27;69(12 Suppl):SS5-10.

46. Cosio FG, Grande JP, Larson TS, Gloor JM, Velosa JA, Textor SC, et al. Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):1130–6.
47. Tullius SG, Hancock WW, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Reversibility of chronic renal allograft rejection: Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. *Transplantation*. 1994;58(1):93–9.
48. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):931–40.
49. Greenberg A, Egel JW, Thompson ME, Hardesty RL, Griffith BP, Bahnson HT, et al. Early and Late Forms of Cyclosporine Nephrotoxicity: Studies in Cardiac Transplant Recipients. *Am J Kidney Dis*. 1987;9(1):12–22.
50. Mihatsch MJ, Thiel G, Basler V, Ryffel B, Landmann J, von Overbeck J, et al. Morphological patterns in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 1985;17(4 SUPPL. 1):101–16.
51. Mengel M, Mihatsch M, Halloran PF. Histological Characteristics of Calcineurin Inhibitor Toxicity-There Is No Such Thing as Specificity! *Am J Transplant*. 2011 Dec;11(12):2549–50.
52. Fu Q, Liao M, Feng C, Tang J, Liao R, Wei L, et al. Profiling of mRNA of interstitial fibrosis and tubular atrophy with subclinical inflammation in recipients after kidney transplantation. 2019;11.

53. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, Leduc R, Connett J, Kasiske B, et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: A potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant*. 2010;10(9):2066–73.
54. Haas M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: What is in a name? Vol. 23, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 245–50.
55. Vitalone MJ, O’Connell PJ, Jimenez-Vera E, Yuksel A, Wavamunno M, Fung CLS, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in early transplant tubulointerstitial damage. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Aug;19(8):1571–83.
56. Zeisberg M, Duffield JS. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. Vol. 21, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2010. p. 1247–53.
57. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: The role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1367–74.
58. Gerrits JH, van de Wetering J, Drabbels JJ, IJzermans JNM, Claas FHJ, Weimar W, et al. Non-HLA T-cell reactivity during the first year after HLA-identical living-related kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2009 Sep;23(5):740–7.
59. Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Díaz-Molina B, Blanco-García RM, Álvarez-López MR, et al. Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. *Transpl Immunol*. 2006 Dec;17(1):43–6.

60. Aguilera I, Wichmann I, Gentil MA, Gonzalez-Escribano F, Nuñez-Roldan A. Antibodies against the donor antigen glutathione S-transferase T1 after renal transplantation. In: Transplantation Proceedings. Transplant Proc; 2005. p. 1457–8.
61. Reinsmoen NL. Role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in solid organ transplantation. Hum Immunol. 2013 Nov;74(11):1474–7.
62. Parra T, De Arriba G, Conejo JR, Cantero M, Arribas I, Rodríguez-Puyol D, et al. Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: Effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation. 1998 Nov 27;66(10):1325–9.
63. Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. Vol. 293, American Journal of Physiology - Renal Physiology. Am J Physiol Renal Physiol; 2007.
64. Albrecht EWJA, Stegeman CA, Tiebosch ATMG, Tegzess AM, Van Goor H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. Am J Transplant. 2002 May;2(5):448–53.
65. Siekierka-Harreis M, Kuhr N, Willers R, Ivens K, Grabensee B, Mondry A, et al. Impact of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and of non-genetic factors on kidney transplant function - A single-center experience. Clin Transplant. 2009 Sep;23(5):606–15.
66. Fedor R, Asztalos L, Lócsey L, Szabó L, Mányiné IS, Fagyas M, et al.

- Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme as a risk factor for chronic allograft nephropathy. In: Transplantation Proceedings. Transplant Proc; 2010. p. 2304–8.
67. Arend SM, Mallat MJK, Westendorp RJW, Van Der Woude FJ, Van Es LA. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. Nephrol Dial Transplant. 1997 Aug;12(8):1672–9.
68. US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Am J Kidney Dis. 2020 Jan;75(1):S1–64.
69. Yu M yeon, Kim YC, Lee JP, Lee H, Kim YS. Death with graft function after kidney transplantation: a single-center experience. Clin Exp Nephrol. 2018 Jun 1;22(3):710–8.
70. Rigatto C, Parfrey P, Foley R, Negrijn C, Tribula C, Jeffery J. Congestive heart failure in renal transplant recipients: Risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13(4):1084–90.
71. Lentine KL, Brennan DC, Schnitzler MA. Incidence and predictors of myocardial infarction after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2005;16(2):496–506.
72. Pilmore H, Dent H, Chang S, McDonald SP, Chadban SJ. Reduction in cardiovascular death after kidney transplantation. Transplantation. 2010 Apr;89(7):851–7.
73. Meier-Kriesche HU, Baliga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. In: Transplantation. Transplantation; 2003. p. 1291–5.

74. Marcén R, Morales JM, Fernández-Juárez G, Andrés A, Pascual J, Rodicio JL, et al. Risk factors of ischemic heart disease after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2002;34(1):394–5.
75. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2004 Jun;4(6):905–13.
76. Acuna SA, Fernandes KA, Daly C, Hicks LK, Sutradhar R, Kim SJ, et al. Cancer mortality among recipients of solid-organ transplantation in Ontario, Canada. *JAMA Oncol.* 2016 Apr 1;2(4):463–9.
77. Piselli P, Serraino D, Segoloni GP, Sandrini S, Piredda GB, Scolari MP, et al. Risk of de novo cancers after transplantation: Results from a cohort of 7217 kidney transplant recipients, Italy 1997-2009. *Eur J Cancer.* 2013 Jan;49(2):336–44.
78. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2011 Nov 2;306(17):1891–901.
79. Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: The role of immunosuppression. Vol. 6, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2010. p. 511–9.
80. Maluccio M, Sharma V, Lagman M, Vyas S, Yang H, Li B, et al. Tacrolimus enhances transforming growth factor- β 1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation.* 2003 Aug 15;76(3):597–602.
81. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis:

- involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2002 Feb 1;8(2):128–35.
82. Campistol J, Morales J. Manejo de tumores tras el trasplante renal. *Nefrología*. 2009;29(Supl.2):33–45.
83. Marcén R, Pascual J, Tato AM, Teruel JL, Villafruela JJ, Fernández M, et al. Influence of immunosuppression on the prevalence of cancer after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2003 Aug;35(5):1714–6.
84. Gutierrez-Dalmau A, Campistol JM. Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs*. 2007;67(8):1167–98.
85. Pendón-Ruiz De Mier V, Navarro Cabello MD, Martínez Vaquera S, Lopez-Andreu M, Aguera Morales ML, Rodriguez-Benot A, et al. Incidence and Long-Term Prognosis of Cancer after Kidney Transplantation. In: *Transplantation Proceedings*. Elsevier USA; 2015. p. 2618–21.
86. Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. Vol. 80, *Transplantation*. Transplantation; 2005.
87. Végso G, Tóth M, Hídvégi M, Toronyi É, Langer RM, Dinya E, et al. Malignancies after renal transplantation during 33 years at a single center. *Pathol Oncol Res*. 2007 Mar 31;13(1):63–9.
88. Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M. Rapamycin blocks tumor progression: Unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation*. 2002 May 27;73(10):1565–72.
89. Campistol JM, Cuervas-Mons V, Manito N, Almenar L, Arias M, Casafont F, et

- al. New concepts and best practices for management of pre- and post-transplantation cancer. Vol. 26, Transplantation Reviews. Transplant Rev (Orlando); 2012. p. 261–79.
90. Sehgal SN, Molnar-Kimber K, Ocain TD, Weichman BM. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med Res Rev.* 1994 Jan;14(1):1–22.
91. Groth CG, Bäckman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation.* 1999 Apr 15;67(7):1036–42.
92. Watson CJE, Firth J, Williams PF, Bradley JR, Pritchard N, Chaudhry A, et al. A randomized controlled trial of late conversion from CNI-based to sirolimus-based immunosuppression following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2005;5(10):2496–503.
93. Stallone G. Rapamycin for Treatment of Chronic Allograft Nephropathy in Renal Transplant Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Dec 1;16(12):3755–62.
94. Oberbauer R, Segoloni G, Campistol JM, Kreis H, Mota A, Stallone G, et al. Early cyclosporine withdrawal from a sirolimus-based regimen results in better renal allograft survival and renal function at 48 months after transplantation. 2005;18:22–8.
95. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, Westeel PF, Etienne I, Thervet E, et al. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: Concept study. *Am J Transplant.* 2009

May;9(5):1115–23.

96. Lebranchu Y, Thierry A, Thervet E, Büchler M, Etienne I, Westeel PF, et al. Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF-four-year results of the postconcept study. *Am J Transplant*. 2011 Aug;11(8):1665–75.
97. Guba M, Pratschke J, Hugo C, Krämer BK, Nohr-Westphal C, Brockmann J, et al. Renal function, efficacy, and safety of sirolimus and mycophenolate mofetil after short-term calcineurin inhibitor-based quadruple therapy in de novo renal transplant patients: One-year analysis of a randomized multicenter trial. *Transplantation*. 2010 Jul 27;90(2):175–83.
98. Guba M, Pratschke J, Hugo C, Krämer BK, Pascher A, Pressmar K, et al. Early conversion to a sirolimus-based, calcineurin-inhibitor-free immunosuppression in the SMART trial: Observational results at 24 and 36 months after transplantation. *Transpl Int*. 2012 Apr;25(4):416–23.
99. Mjörnstedt L, Sørensen SS, Von Zur Mühlen B, Jespersen B, Hansen JM, Bistrup C, et al. Improved renal function after early conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus: A randomized trial in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2012 Oct;12(10):2744–53.
100. Budde K, Lehner F, Sommerer C, Reinke P, Arns W, Eisenberger U, et al. Five-year outcomes in kidney transplant patients converted from cyclosporine to everolimus: The randomized ZEUS study. *Am J Transplant*. 2015;15(1):119–28.
101. Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L, Shidban H, Waid TH, Preston D, et al.

- Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: A randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int.* 2011;79(8):897–907.
102. Heilman RL, Younan K, Wadei HM, Mai ML, Reddy KS, Chakkera HA, et al. Results of a prospective randomized trial of sirolimus conversion in kidney transplant recipients on early corticosteroid withdrawal. Vol. 92, *Transplantation*. Transplantation; 2011. p. 767–73.
103. de Fijter JW, Holdaas H, Øyen O, Sanders JS, Sundar S, Bemelman FJ, et al. Early Conversion From Calcineurin Inhibitor- to Everolimus-Based Therapy Following Kidney Transplantation: Results of the Randomized ELEVATE Trial. *Am J Transplant.* 2017 Jul 1;17(7):1853–67.
104. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, Del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009 Jan 27;87(2):233–42.
105. Weir MR, Pearson TC, Patel A, Peddi VR, Kalil R, Scandling J, et al. Long-term Follow-up of Kidney Transplant Recipients in the Spare-the-Nephron-Trial. *Transplantation.* 2017;101(1):157–65.
106. Mulay A V, Cockfield S, Stryker R, Fergusson D, Knoll GA. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation.* 2006 Nov 15;82(9):1153–62.
107. Fervenza FC, Fitzpatrick PM, Mertz J, Erickson SB, Liggett S, Popham S, et al.

- Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 May 1;19(5):1288–92.
108. Wu MS, Chang CT, Hung CC. Rapamycin in patients with chronic renal allograft dysfunction. *Clin Transplant*. 2005 Apr;19(2):236–42.
109. Sánchez-Fructuoso AI, Ruiz JC, Calvo N, Rodrigo E, Perez-Flores I, Gómez-Alamillo C, et al. Everolimus as primary immunosuppression in kidney transplantation: Experience in conversion from calcineurin inhibitors. *Transplantation*. 2012;93(4):398–405.
110. Ruiz JC, Campistol JM, Sánchez-Fructuoso A, Rivera C, Oliver J, Ramos D, et al. Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(11):3252–7.
111. Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. Vol. 28, *Transplant International*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 10–21.
112. Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. Vol. 114, *Circulation Research*. Circ Res; 2014. p. 549–64.
113. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009 Jul 16;460(7253):392–5.
114. Paoletti E, Amidone M, Cassottana P, Gherzi M, Marsano L, Cannella G. Effect

- of Sirolimus on Left Ventricular Hypertrophy in Kidney Transplant Recipients: A 1-Year Nonrandomized Controlled Trial. *Am J Kidney Dis.* 2008 Aug;52(2):324–30.
115. Paoletti E, Marsano L, Bellino D, Cassottana P, Cannella G. Effect of everolimus on left ventricular hypertrophy of de novo kidney transplant recipients: A 1 year, randomized, controlled trial. *Transplantation.* 2012 Mar 15;93(5):503–8.
 116. Cruzado JM, Pascual J, Sánchez-Fructuoso A, Serón D, Díaz JM, Rengel M, et al. Controlled randomized study comparing the cardiovascular profile of everolimus with tacrolimus in renal transplantation. *Transpl Int.* 2016 Dec 1;29(12):1317–28.
 117. Kurdi A, Martinet W, de Meyer GRY. mTOR Inhibition & Cardiovascular Diseases: Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Transplantation.* 2017 Feb 23;102(2S Suppl 1).
 118. Vergès B. mTOR and Cardiovascular Diseases: Diabetes Mellitus. *Transplantation.* 2017 Mar 4;102(2S Suppl 1).
 119. Lamming DW, Sabatini DM. A central role for mTOR in lipid homeostasis. Vol. 18, *Cell Metabolism.* Cell Press; 2013. p. 465–9.
 120. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* (80-). 2012 Mar 30;335(6076):1638–43.
 121. Bussiere CT, Lakey JRT, Shapiro AMJ, Korbitt GS. The impact of the mTOR inhibitor sirolimus on the proliferation and function of pancreatic islets and ductal cells. *Diabetologia.* 2006 Oct;49(10):2341–9.

122. Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, Grinyó J, Legendre C, Russ G, et al. The ORION study: Comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011 Aug;11(8):1633–44.
123. Murakami N, Riella L V., Funakoshi T. Risk of metabolic complications in kidney transplantation after conversion to mTOR inhibitor: A systematic review and meta-analysis. Vol. 14, *American Journal of Transplantation*. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 2317–27.
124. Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, Vítko S, Hugo C, Demirbas A, et al. Calcineurin inhibitor minimization in the symphony study: Observational results 3 years after transplantation. *Am J Transplant*. 2009 Aug;9(8):1876–85.
125. MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation*. 2001 Jan 27;71(2):271–80.
126. Rad E, Murray JT, Tee AR. Oncogenic signalling through mechanistic target of rapamycin (mTOR): A driver of metabolic transformation and cancer progression. Vol. 10, *Cancers*. MDPI AG; 2018.
127. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, et al. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2005 Mar 31;352(13):1317–23.
128. Crespo-Leiro MG, Alonso-Pulpón L, Vázquez De Prada JA, Almenar L, Arizón

- JM, Brossa V, et al. Malignancy after heart transplantation: Incidence, prognosis and risk factors. *Am J Transplant*. 2008 May;8(5):1031–9.
129. Carenco C, Assenat E, Faure S, Duny Y, Danan G, Bismuth M, et al. Tacrolimus and the risk of solid cancers after liver transplant: A dose effect relationship. *Am J Transplant*. 2015 Mar 1;15(3):678–86.
130. Gutiérrez-Dalmau Á, Campistol JM. The role of proliferation signal inhibitors in post-transplant malignancies. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 May;22(SUPPL. 1).
131. Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK. Rapamycin and tumor growth: Mechanisms behind its anticancer activity. *Transplant Rev*. 2005 Jan 1;19(1):20–31.
132. Kauffman HM, Cherikh WS, McBride MA, Cheng Y, Hanto DW. Post-transplant de novo malignancies in renal transplant recipients: The past and present. Vol. 19, *Transplant International*. Transpl Int; 2006. p. 607–20.
133. Jardine AG. Proceedings of the 13th international transplantation symposia: mTOR-inhibition: what have we learned and how so we best apply the learning. *Transplant Res*. 2015 Dec;4(S1):1–3.
134. Pascual J, Royuela A, Fernández AM, Herrero I, Delgado JF, Solé A, et al. Role of mTOR inhibitors for the control of viral infection in solid organ transplant recipients. Vol. 18, *Transplant Infectious Disease*. Blackwell Publishing Inc.; 2016. p. 819–31.
135. Garcia K, Sun Z, Mattson E, Li L, Smyth K, Xiao Z. IL-12 is required for mTOR regulation of memory CTLs during viral infection. *Genes Immun*. 2014 Jun 5;15(6):413–23.

136. Jagannath C, Bakhru P. Rapamycin-induced enhancement of vaccine efficacy in mice. *Methods Mol Biol.* 2012;821:295–303.
137. He L, Zang A, Du M, Ma D, Yuan C, Zhou C, et al. mTOR regulates TLR-induced c-fos and Th1 responses to HBV and HCV vaccines. *Virol Sin.* 2015 Jun 1;30(3):174–89.
138. Bowman LJ, Brueckner AJ, Doligalski CT. The Role of mTOR Inhibitors in the Management of Viral Infections: A Review of Current Literature. Vol. 102, *Transplantation. NLM (Medline)*; 2018. p. S50–9.
139. Tang-Feldman YJ, Lochhead GR, Lochhead SR, Yu C, Pomeroy C. Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice. *Inflamm Res.* 2011 Mar;60(3):233–43.
140. Egli A, Kumar D, Broscheit C, O'Shea D, Humar A. Comparison of the effect of standard and novel immunosuppressive drugs on CMV-specific T-cell cytokine profiling. *Transplantation.* 2013 Feb 15;95(3):448–55.
141. Havenith SHC, Yong S La, Van Donselaar-Van Der Pant KAMI, Van Lier RAW, Ten Berge IJM, Bemelman FJ. Everolimus-treated renal transplant recipients have a more robust CMV-specific CD8+ T-Cell response compared with cyclosporine- or mycophenolate-treated patients. *Transplantation.* 2013 Jan 15;95(1):184–91.
142. Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Oliveira N, Sandes-Freitas T, et al. Reduced Incidence of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus and Reduced Tacrolimus Doses. *Am J*

Transplant. 2015 Oct 1;15(10):2655–64.

143. Andrassy J, Hoffmann VS, Rentsch M, Stangl M, Habicht A, Meiser B, et al. Is cytomegalovirus prophylaxis dispensable in patients receiving an mtor inhibitor-based immunosuppression? a systematic review and meta-analysis. Vol. 94, Transplantation. Transplantation; 2012. p. 1208–17.
144. Nashan B, Gaston R, Emery V, Säemann MD, Mueller NJ, Couzi L, et al. Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. Vol. 93, Transplantation. Transplantation; 2012. p. 1075–85.
145. Boothpur R, Brennan DC. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. Vol. 47, Journal of Clinical Virology. J Clin Virol; 2010. p. 306–12.
146. Borni-Duval C, Caillard S, Olagne J, Perrin P, Braun-Parvez L, Heibel F, et al. Risk factors for BK virus infection in the era of therapeutic drug monitoring. Transplantation. 2013 Jun 27;95(12):1498–505.
147. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. Am J Transplant. 2005 Mar 1;5(3):582–94.
148. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: A prospective, randomized, multicenter study. Am J Transplant. 2013 Jan;13(1):136–45.

149. Rahamimov R, Lustig S, Tovar A, Yussim A, Bar-Nathan N, Shaharabani E, et al. BK polyoma virus nephropathy in kidney transplant recipient: The role of new immunosuppressive agents. In: Transplantation Proceedings. Elsevier Inc.; 2003. p. 604–5.
150. Wojciechowski D, Chandran S, Webber A, Hirose R, Vincenti F. Mycophenolate Mofetil Withdrawal With Conversion to Everolimus to Treat BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2017 Oct 1;49(8):1773–8.
151. Egli A, Köhli S, Dickenmann M, Hirsch HH. Inhibition of polyomavirus BK-specific t-cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation.* 2009 Nov;88(10):1161–8.
152. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant.* 2010 Dec;10(12):2615–23.
153. Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK-virus and the impact of pre-emptive immunosuppression reduction: 5-year results. *Am J Transplant.* 2010 Feb;10(2):407–15.
154. Saad ER, Bresnahan BA, Cohen EP, Lu N, Orentas RJ, Vasudev B, et al. Successful treatment of BK viremia using reduction in immunosuppression without antiviral therapy. *Transplantation.* 2008 Mar;85(6):850–4.
155. Wali RK, Drachenberg C, Hirsch HH, Papadimitriou J, Nahar A, Mohanlal V, et al. BK virus-associated nephropathy in renal allograft recipients: Rescue therapy

- by sirolimus-based immunosuppression. *Transplantation*. 2004 Oct 15;78(7):1069–73.
156. Sánchez Fructuoso AI, Calvo N, Perez-Flores I, Valero R, Rodríguez-Sánchez B, García de Viedma D, et al. Mammalian target of rapamycin signal inhibitors could play a role in the treatment of BK polyomavirus nephritis in renal allograft recipients. *Transpl Infect Dis*. 2011 Dec;13(6):584–91.
157. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Joseph Kim S, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation a randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014 Nov 26;312(20):2106–14.
158. Lee BT, Gabardi S, Grafals M, Hofmann RM, Akalin E, Aljanabi A, et al. Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: A multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Mar 7;9(3):583–9.
159. Guasch A, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, Fitzsimmons W, Holman J, First MR. Assessment of efficacy and safety of FK778 in comparison with standard care in renal transplant recipients with untreated BK nephropathy. *Transplantation*. 2010 Oct 27;90(8):891–7.
160. Van Doesum WB, Gard L, Bemelman FJ, de Fijter JW, Homan van der Heide JJ, Niesters HG, et al. Incidence and outcome of BK polyomavirus infection in a multicenter randomized controlled trial with renal transplant patients receiving cyclosporine-, mycophenolate sodium-, or everolimus-based low-dose immunosuppressive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2017 Jun 1;19(3).

161. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: An open-label, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9768):837–47.
162. Cibrik D, Silva HT, Vathsala A, Lackova E, Cornu-Artis C, Walker RG, et al. Randomized trial of everolimus-facilitated calcineurin inhibitor minimization over 24 months in renal transplantation. *Transplantation*. 2013 Apr 15;95(7):933–42.
163. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):1019–26.
164. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, Lotfi T, McMullan C, Gabardi S, et al. CMV and BKPyV infections in renal transplant recipients receiving an mtor inhibitor–based regimen versus a cni-based regimen: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(8):1321–36.
165. Le J, Durand CM, Agha I, Brennan DC. Epstein–Barr virus and renal transplantation. Vol. 31, *Transplantation Reviews*. W.B. Saunders; 2017. p. 55–60.
166. Cullis B, D’Souza R, McCullagh P, Harries S, Nicholls A, Lee R, et al. Sirolimus-Induced Remission of Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *Am J Kidney Dis*. 2006 May;47(5).
167. Sampaio MS, Cho YW, Shah T, Bunnapradist S, Hutchinson I V. Association of immunosuppressive maintenance regimens with posttransplant

- lymphoproliferative disorder in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):73–81.
168. Yaich S, Charfeddine K, Zaghdane S, El Aoud N, Jarraya F, Kharrat M, et al. Sirolimus for the treatment of kaposi sarcoma after renal transplantation: A series of 10 cases. In: *Transplantation Proceedings*. Transplant Proc; 2012. p. 2824–6.
169. Ventura-Aguiar P, Campistol JM, Diekmann F. Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. Vol. 15, *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 303–19.
170. Wali RK, Mohanlal V, Ramos E, Blahut S, Drachenberg C, Papadimitriou J, et al. Early withdrawal of calcineurin inhibitors and rescue immunosuppression with sirolimus-based therapy in renal transplant recipients with moderate to severe renal dysfunction. *Am J Transplant*. 2007 Jun;7(6):1572–83.
171. Jia J, Dellinger AE, Weiss ES, Bulusu A, Rushing C, Li H, et al. Direct evidence of target inhibition with anti-VEGF, EGFR, and mTOR therapies in a clinical model of wound healing. *Clin Cancer Res*. 2015 Aug 1;21(15):3442–52.
172. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor β -stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. In: *Transplantation Proceedings*. 1991. p. 2833–6.
173. Grim SA, Slover CM, Sankary H, Oberholzer J, Benedetti E, Clark NM. Risk Factors for Wound Healing Complications in Sirolimus-Treated Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc*. 2006 Dec;38(10):3520–3.
174. Ersoy A, Koca N. Everolimus-induced lymphedema in a renal transplant recipient:

A case report. *Exp Clin Transplant*. 2012 Jun 1;10(3):296–8.

175. Pascual J, Diekmann F, Fernández-Rivera C, Gómez-Marqués G, Gutiérrez-Dalmau A, Pérez-Sáez MJ, et al. Recomendaciones para el uso de everolimus en trasplante renal de novo: falsas creencias, mitos y realidades. *Nefrologia*. 2017;37(3):253–66.
176. Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*. 2001;7(2):199–205.
177. Porta C, Osanto S, Ravaud A, Climent MA, Vaishampayan U, White DA, et al. Management of adverse events associated with the use of everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2011 Jun;47(9):1287–98.
178. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132–41.
179. Singh U, Gupta A, Jasuja S. Sirolimus-induced pneumonitis. *Indian J Nephrol*. 2009 Apr 1;19(2):80–1.
180. Amer H, Fidler ME, Myslak M, Morales P, Kremers WK, Larson TS, et al. Proteinuria after kidney transplantation, relationship to allograft histology and survival. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2748–56.
181. Amer H, Lieske JC, Rule AD, Kremers WK, Larson TS, Franco Palacios CR, et al. Urine high and low molecular weight proteins one-year post-kidney transplant: relationship to histology and graft survival. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):676–84.

182. Arias-Cabrales C, Redondo-Pachón D, Pérez-Sáez MJ, Gimeno J, Sánchez-Güerri I, Bermejo S, et al. Supervivencia del injerto renal según la categoría de Banff 2013 en biopsia por indicación. *Nefrología*. 2016 Nov;36(6):660–6.
183. Knoll GA. Proteinuria in Kidney Transplant Recipients: Prevalence, Prognosis, and Evidence-Based Management. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(6):1131–44.
184. Roodnat JJ, Mulder PGH, Rischen-Vos J, Van Riemsdijk IC, Van Gelder T, Zietse R, et al. Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation*. 2001 Aug 15;72(3):438–44.
185. Fernández-Fresnedo G, Plaza JJ, Sánchez-Plumed J, Sanz-Guajardo A, Palomar-Fontanet R, Arias M. Proteinuria: a new marker of long-term graft and patient survival in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jun 1;19 Suppl 3(suppl_3):iii47-51.
186. Boratyńska M, Banasik M, Watorek E, Falkiewicz K, Patrzalek D, Szyber P, et al. Conversion to sirolimus from cyclosporine may induce nephrotic proteinuria and progressive deterioration of renal function in chronic allograft nephropathy patients. *Transplant Proc*. 2006 Jan;38(1):101–4.
187. Morelon E, Kreis H. Sirolimus therapy without calcineurin inhibitors: Necker Hospital 8-year experience. *Transplant Proc*. 2003 May;35(3 Suppl):52S-57S.
188. Bumbea V, Kamar N, Ribes D, Esposito L, Modesto A, Guitard J, et al. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Nov;20(11):2517–23.

189. Skhiri H, Morelon E, Noel L-H, Mamzer-Bruneel M-F, Legendre C, Peraldi M-N, et al. Unusual post-transplantation recurrence of focal segmental glomerulosclerosis which resolved with cyclosporine but not with sirolimus. *Transpl Int.* 2005 Apr;18(4):458–60.
190. Saurina A, Campistol JM, Piera C, Diekmann F, Campos B, Campos N, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft dysfunction: changes in glomerular haemodynamics and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Feb 1;21(2):488–93.
191. Letavernier E, Peraldi MN, Pariente A, Morelon E, Legendre C. Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation.* 2005;80(9):1198–203.
192. Van Den Akker JM, Wetzels JFM, Hoitsma AJ. Proteinuria following conversion from azathioprine to sirolimus in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2006;70(7):1355–7.
193. Büchler M, Caillard S, Barbier S, Thervet E, Toupance O, Mazouz H, et al. Sirolimus versus cyclosporine in kidney recipients receiving thymoglobulin®, mycophenolate mofetil and a 6-month course of steroids. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2522–31.
194. Glotz D, Charpentier B, Abramovicz D, Lang P, Rostaing L, Rifle G, et al. Thymoglobulin induction and sirolimus versus tacrolimus in kidney transplant recipients receiving mycophenolate mofetil and steroids. *Transplantation.* 2010;89(12):1511–7.

195. Joles JA, van Goor H, van der Horst ML, van Tol A, Elema JD, Koomans HA. High lipid levels in very low density lipoprotein and intermediate density lipoprotein may cause proteinuria and glomerulosclerosis in aging female analbuminemic rats. *Lab Invest.* 1995 Dec;73(6):912–21.
196. Lim LM, Kung LF, Kuo MC, Kuo HT. The Risk Factors of mTORi-Associated Posttransplant Proteinuria. *Transplant Proc.* 2018;50(8):2535–8.
197. Tozawa M, Iseki K, Iseki C, Oshiro S, Ikemiya Y, Takishita S. Triglyceride, but not total cholesterol or low-density lipoprotein cholesterol levels, predict development of proteinuria. *Kidney Int.* 2002 Nov;62(5):1743–9.
198. Izzedine H, Brocheriou I, Frances C. Post-transplantation proteinuria and sirolimus. *N Engl J Med.* 2005 Nov 10;353(19):2088–9.
199. Straathof-Galema L, Wetzels JFM, Dijkman HBPM, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant.* 2006 Feb;6(2):429–33.
200. Baan C, Peeters A, Lemos F, Uitterlinden A, Doxiadis I, Claas F, et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am J Transplant.* 2004 May;4(5):811–8.
201. Kunter U, Floege J, von Jürgensonn AS, Stojanovic T, Merkel S, Gröne HJ, et al. Expression of A20 in the vessel wall of rat-kidney allografts correlates with protection from transplant arteriosclerosis. *Transplantation.* 2003 Jan 15;75(1):3–9.
202. Siracuse JJ, Fisher MD, da Silva CG, Peterson CR, Csizmadia E, Moll HP, et al.

- A20-mediated modulation of inflammatory and immune responses in aortic allografts and development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. 2012 Feb 27;93(4):373–82.
203. Enesa K, Moll HP, Luong L, Ferran C, Evans PC. A20 suppresses vascular inflammation by recruiting proinflammatory signaling molecules to intracellular aggresomes. *FASEB J*. 2015 May;29(5):1869–78.
204. Guan F, Villegas G, Teichman J, Mundel P, Tufro A. Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Aug;291(2):F422-8.
205. Foster RR, Satchell SC, Seckley J, Emmett MS, Joory K, Xing CY, et al. VEGF-C promotes survival in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jul;291(1):F196-207.
206. Kang D-H, Johnson RJ. Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003 Jan;12(1):43–9.
207. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2001 Aug;159(2):599–608.
208. Kang D-H, Joly AH, Oh S-W, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired Angiogenesis in the Remnant Kidney Model: I. Potential Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Thrombospondin-1. 2001.

209. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1448–57.
210. Simon M, Gröne HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol*. 1995 Feb;268(2 Pt 2):F240-50.
211. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):794–814.
212. Alvarez Arroyo MV, Suzuki Y, Yagüe S, Lorz C, Jiménez S, Soto C, et al. Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity. *Transplantation*. 2002 Dec 15;74(11):1618–24.
213. Lemos FBC, Ijzermans JNM, Zondervan PE, Peeters AMA, van den Engel S, Mol WM, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3278–87.
214. Kretzler M, Schröppel B, Merkle M, Huber S, Mundel P, Horster M, et al. Detection of multiple vascular endothelial growth factor splice isoforms in single glomerular podocytes. *Kidney Int Suppl*. 1998 Sep;67:S159-61.
215. Liu E, Morimoto M, Kitajima S, Koike T, Yu Y, Shiiki H, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jul 1;18(7):2094–

216. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11947–54.
217. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res.* 2000;37(6):443–8.
218. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson I V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jan;13(1):260–4.
219. Lemos FBC, Mol WM, Roodnat JJ, Uitterlinden A, Ijzermans JNM, Weimar W, et al. The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor on graft survival after kidney transplantation. *Transplantation.* 2005 May 15;79(9):1221–5.
220. Günesacar R, Opelz G, Erken E, Pelzl S, Döhler B, Ruhenstroth A, et al. VEGF 936 C/T gene polymorphism in renal transplant recipients: association of the T allele with good graft outcome. *Hum Immunol.* 2007 Jul;68(7):599–602.
221. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson I V. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999 Dec;60(12):1245–9.

222. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1232–5.
223. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A Common Polymorphism in the 5' -Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(5):1635–9.
224. Eubank TD, Galloway M, Montague CM, Waldman WJ, Marsh CB. M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2637–43.
225. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*. 1995 Sep 15;55(18):4140–5.
226. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tudor RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol*. 1998 Sep;275(3 Pt 2):H1054–61.
227. Butler JM. DNA Quantitation. In: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Elsevier; 2010. p. 111–24.
228. Morales JM, Wramner L, Kreis H, Durand D, Campistol JM, Andres A, et al. Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal

- transplant recipients. *Am J Transplant*. 2002 May;2(5):436–42.
229. Gill JS, Tonelli M, Mix CH, Pereira BJG. The change in allograft function among long-term kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun 1;14(6):1636–42.
230. Shulman NB, Ford CE, Dallas Hall W, Blaufox DM, Simon D, Langford HG, et al. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function: Results from the hypertension detection and follow-up program. *Hypertension*. 1989;13(5):I-80-I-93.
231. Massy ZA, Khoa TN, Lacour B, Descamps-Latscha B, Man NK, Jungers P. Dyslipidaemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(10):2392–7.
232. Nguyen LS, Vautier M, Allenbach Y, Zahr N, Benveniste O, Funck-Brentano C, et al. Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. Vol. 42, Drug Safety. Springer International Publishing; 2019.
233. Diekmann F, Andrés A, Oppenheimer F. mTOR inhibitor-associated proteinuria in kidney transplant recipients. 2012;
234. Ojo AO, Morales JM, González-Molina M, Steffick DE, Luan FL, Merion RM, et al. Comparison of the long-term outcomes of kidney transplantation: USA versus Spain. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Jan;28(1):213–20.
235. Gutiérrez MJ, González E, Andrés A, Morales JM. Clinical Implications of Proteinuria in Renal Transplant Recipients Switching to Rapamycin for Chronic

- Allograft Dysfunction. *Transplant Proc.* 2009 Jul;41(6):2348–50.
236. First MR, Vaidya PN, Maryniak RK, Weiss MA, Munda R, Fidler JP, et al. Proteinuria following transplantation: Correlation with histopathology and outcome. *Transplantation.* 1984;38(6):605–11.
237. Vathsal A, Verani R, Schoenberg L, Lewis RM, Van Buren CT, Kerman RH, et al. Proteinuria in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 1990;49(1):35–41.
238. Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Verter J. The prognostic significance of proteinuria: The Framingham study. *Am Heart J.* 1984;108(5):1347–52.
239. Aliabadi AZ, Pohanka E, Seebacher G, Dunkler D, Kammerstätter D, Wolner E, et al. Development of proteinuria after switch to sirolimus-based immunosuppression in long-term cardiac transplant patients. *Am J Transplant.* 2008 Apr;8(4):854–61.
240. Naesens M, Lerut E, Emonds MP, Herelixka A, Evenepoel P, Claes K, et al. Proteinuria as a Noninvasive Marker for Renal Allograft Histology and Failure: An Observational Cohort Study. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Jan 1;27(1):281–92.
241. Diekmann F, Budde K, Oppenheimer F, Pritsche L, Neumayer HH, Campistol JM. Predictors of success in conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus in chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant.* 2004 Nov;4(11):1869–75.
242. Hohage H, Kleyer U, Brückner D, August C, Zidek W, Spieker C. Influence of Proteinuria on Long-Term Transplant Survival in Kidney Transplant Recipients. *Nephron.* 1997;75(2):160–5.

243. Sancho A, Gavela E, Ávila A, Morales A, Fernández-Nájera JE, Crespo JF, et al. Risk Factors and Prognosis for Proteinuria in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2145–7.
244. Ibis A, Akgül A, Ozdemir N, Colak T, Sezer S, Arat Z, et al. Posttransplant Proteinuria Is Associated With Higher Risk of Cardiovascular Disease and Graft Failure in Renal Transplant Patients. *Transplant Proc.* 2009 Jun;41(5):1604–8.
245. Khedr E, El Sharkawy M, El Shahawy Y, Sany D, Sayed H. Proteinuria in Egyptian renal transplant recipients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2015 Jan 1;26(1):161–7.
246. Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, Laouad I, Chatelet V, Marlière JF, et al. Urinary albumin excretion and the risk of graft loss and death in proteinuric and non-proteinuric renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007 Mar;7(3):618–25.
247. Kasiske BL, Chakkerla HA, Louis TA, Ma JZ. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trials in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(10):1910–7.
248. Armstrong KA, Campbell SB, Hawley CM, Nicol DL, Johnson DW, Isbel NM. Obesity is Associated with Worsening Cardiovascular Risk Factor Profiles and Proteinuria Progression in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2005;5:2710–8.
249. Guijarro C, Kim Y, Schoonover CM, Massy ZA, O'Donnell MP, Kasiske BL, et al. Lovastatin inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 1996 Jun 1;11(6):990–6.

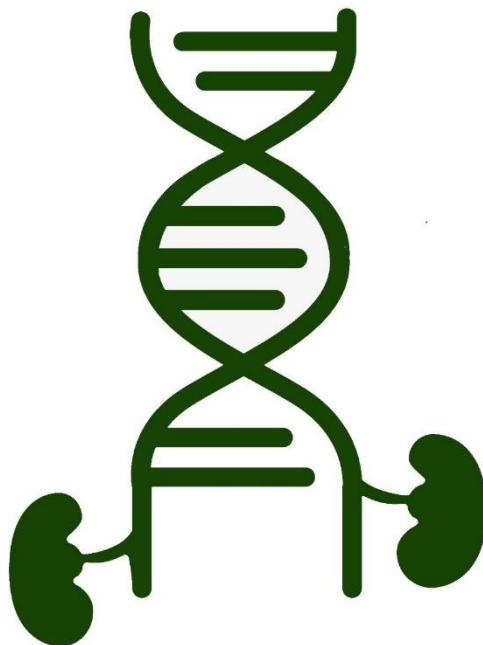
250. Moorhead JF, El-Nahas M, Chan MK, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet*. 1982 Dec 11;320(8311):1309–11.
251. Keane WF, O'Donnell MP, Kasiske BL, Kim Y. Oxidative modification of low-density lipoproteins by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1993;4(2):187–94.
252. Miyata J, Takebayashi S. Effect of hyperlipidemia on glomerular sclerosis in unilateral nephrectomized rats. *Pathol Int*. 1987;37(9):1433–9.
253. Nishida Y, Yorioka N, Oda H, Yamakido M. Effect of lipoproteins on cultured human mesangial cells. *Am J Kidney Dis*. 1997;29(6):919–30.
254. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: Immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int*. 1996;49(2):518–24.
255. Kripl P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;106(4):468–71.
256. Wu GY, Hasenberg T, Magdeburg R, Bönninghoff R, Sturm JW, Keese M. Association between EGF, TGF- β 1, VEGF gene polymorphism and colorectal cancer. *World J Surg*. 2009 Jan 15;33(1):124–9.
257. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünwald K, Stockhammer G, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 2000 May 13;355(9216):1688–91.

258. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, Van Kemenade FJ, Van Es LA, Bruijn JA, Van Krieken JHJM. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*. 2001 Jan 6;357(9249):33–7.
259. Mreich E, Coombes JD, Rangan GK. Sirolimus does not reduce receptor-mediated endocytosis of albumin in proximal tubule cells [6]. Vol. 83, *Transplantation*. Transplantation; 2007. p. 105–7.
260. Coombes JD, Mreich E, Liddle C, Rangan GK. Rapamycin worsens renal function and intratubular cast formation in protein overload nephropathy. *Kidney Int*. 2005 Dec;68(6):2599–607.
261. Letavernier E, Legendre C. mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management. *Transplant Rev*. 2008;22(2):125–30.
262. Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, Hörl WH, Pohanka E. Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transpl Int*. 2004 May 1;17(4):215–20.
263. Liew A, Chiang GSC, Vathsala A. Factors associated with proteinuria in renal transplant recipients treated with sirolimus. *Transpl Int*. 2009 Mar;22(3):313–22.
264. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, Van Huyen JPD, Péraldi MN, Helal I, et al. High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 Mar;2(2):326–33.
265. Letavernier E, Bruneval P, Vandermeersch S, Perez J, Mandet C, Belair MF, et al. Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial*

- Transplant. 2009 Feb;24(2):630–8.
266. Zhang HT, Wang WW, Ren LH, Zhao XX, Wang ZH, Zhuang DL, et al. The mTORC2/Akt/NFκB Pathway-Mediated Activation of TRPC6 Participates in Adriamycin-Induced Podocyte Apoptosis. *Cell Physiol Biochem*. 2016 Dec 1;40(5):1079–93.
267. Lenoir O, Jasiek M, Hénique C, Guyonnet L, Hartleben B, Bork T, et al. Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy*. 2015 Jan 1;11(7):1130–45.
268. Estrada CC, Maldonado A, Mallipattu SK. Therapeutic inhibition of VEGF signaling and associated nephrotoxicities. Vol. 30, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2019. p. 187–200.
269. Reinders MEJ, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, et al. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1655–65.
270. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4618–23.
271. Zachary I, Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. Vol. 49, *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res; 2001. p. 568–81.
272. Vidaurreta M, Veganzones S, Rafael S, Arroyo M. Polimorfismos del gen del factor de crecimiento vascular endotelial en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev*

Española Enfermedades Dig. 2010;102(1):26–31.

9. ANEXOS



CEIC Hospital Clínico San Carlos

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES**" con código interno nº 14/438-E del que es Investigadora Principal la **Dra. Ana Sánchez Fructuoso** del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Lo que firmo en Madrid, a 21 de octubre de 2014



Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos



Hospital Clínico San Carlos

CONSEJO DE MADRID

Consentimiento Informado

Hoja de Información al Paciente y Consentimiento

Antes de proceder a la firma del consentimiento informado le rogamos lea la siguiente información.

Espacio para la etiqueta
identificativa del paciente

Aspectos Generales

La participación en el estudio es completamente **voluntaria** y su decisión no afectará a su atención médica.

Los objetivos del estudio, riesgos, inconvenientes, molestias o cualquier otro tipo de información sobre el mismo que usted requiera le serán facilitados por su médico.

Si usted da su consentimiento, en cualquier momento **puede revocarlo** e incluso solicitar la destrucción de las muestras obtenidas.

Título del Estudio

Estudio de polimorfismos genéticos en pacientes trasplantados renales.

Objetivo del Estudio

El objetivo principal es poder establecer marcadores genéticos que puedan ser predictores eficaces de la evolución del trasplante.

Para el estudio, sólo se precisa la obtención de una muestra de sangre.

Beneficios Esperados

Se espera poder profundizar en el conocimiento de las bases genéticas que puedan estar implicadas en supervivencia del injerto renal.

Posibles Efectos Adversos Derivados del Estudio

En el caso de la extracción de una muestra de sangre, sólo se esperan las molestias y riesgos menores que puedan derivarse de su obtención mediante venopunción.

Confidencialidad de los Datos y Seguridad de la Muestra e Información Clínica

De acuerdo con la normativa española y de la Comunidad Europea, su muestra de ADN, y su información clínica será guardada de forma independiente de su información personal, es decir, sus datos del estudio estarán codificados. La información que usted nos proporcione será manejada siguiendo las recomendaciones de la ley de protección de datos vigente (Ley orgánica de protección de datos de carácter personal (LOPD) 15/1999 de 13 de diciembre).

Sus datos serán incluidos en un/unos fichero/s cuyo/s responsable/s son el Biobanco y/o el Hospital Clínico San Carlos. Usted podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndose en contacto con el Biobanco o con el Servicio de Nefrología.

En el caso que estas investigaciones proporcionen **datos que pudieran ser relevantes** para su salud o la de su familia, tiene derecho a que le sean comunicados, si así lo desea. Si la información es relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo.

Cesión de remanentes

Los remanentes de su muestra, podrán ser empleados en otros estudios de la misma línea de investigación del Servicio de Nefrología.

Si **NO** desea ceder los remanentes al Servicio de Nefrología marque la siguiente casilla ☐



Hospital Clínico San Carlos

Comunidad de Madrid

Consentimiento Informado

Cesión a estudios nacionales/internacionales

Su muestra o los remanentes, podrán ser cedidos para estudios nacionales/internacionales de la misma línea de investigación.

Si **NO** desea ceder su muestra/remanente para estudios nacionales/internacionales marque la siguiente casilla ☐

Consentimiento

Yo, (Nombre y Apellidos).....
con DNI

Manifiesto que he leído con detenimiento el documento, he entendido todas las explicaciones y he podido realizar cuantas preguntas he estimado oportunas. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio y para donar la muestra correspondiente.

Fecha y Firma

Firmado por del padre/madre o tutor en el caso de menores de edad ☐

Nombre y firma del responsable que le ha proporcionado la información:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina
SE LE PROPORCIONARÁ UNA COPIA DE ESTE DOCUMENTO SI LO SOLICITA